



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**



POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**Estudio molecular de la resistencia a antibióticos β -
lactámicos y quinolonas de cepas clínicas de
Escherichia coli.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

QFB. JOSÉ CARLOS AGULAR SOLORIO

ASESOR DE TESIS:

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

PUEBLA, PUE.

MARZO, 2019

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por brindarme la oportunidad de realizar este posgrado.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada en la duración de este posgrado, con número de becario 455412
- Al Hospital ISSSTE, por la donación de las cepas incluidas en esta tesis, mediante la colaboración de la Q.F.B. Guadalupe Jiménez Flores, a quién agradezco la confianza, el apoyo y la disponibilidad para resolver cualquier duda.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado en la Convocatoria de Ciencia Básica 2017-2018 con el proyecto titulado: “Estudio de la plataforma genética involucrada en la transferencia de la resistencia a antimicrobianos y genes de virulencia en clones de *Escherichia coli* de interés médico y alimentario”, con clave A1-S-22136.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A mi directora de tesis, la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia, por apoyarme en cada una de las etapas de este proyecto, por la confianza y paciencia que me brindó, por el tiempo invertido, por enseñarme que sin importar el grado de estudios que tengamos no debemos de perder nuestra calidad humana y nuestro estilo y por ser una excelente guía en la elaboración de esta tesis.
- A la D.C. Patricia Lozano Zaráin, por su apoyo y confianza; a pesar de no ser directamente su alumno de maestría, gracias por enseñarme a discutir artículos, a ser más analítico y a cuestionarme sobre todo lo que me rodea así como la importancia de integrar todos los conocimientos para poder enseñar.
- A la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández por el apoyo, consejos, por las excelentes clases de Bases Moleculares, por mostrarme la importancia de siempre profundizar más en el conocimiento, por sus palabras de apoyo que siempre me levantaron el ánimo y por la constante disponibilidad para guiar esta tesis.
- A la D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña, por sus observaciones y sugerencias claras y precisas en los seminarios, por mostrarme que nunca se deben de dar por echo los detalles más mínimos porque son a veces los que más significado tienen. así como sus consejos en la elaboración de este trabajo.
- Al D.C. Miguel Castañeda Lucio, por el apoyo para poder presentar la tesis y así, poderme titular.
- A la M.C. Martha Andrea Mondragón Salinas por su apoyo incondicional en el laboratorio, por sus consejos, por ser un apoyo en los malos momentos y por motivarme cuando nadie más lo hacía, en verdad te convertiste en una buena amiga y un ejemplo a seguir a nivel profesional.
- Al D.C. Gerardo Cortes Cortes por ayudarme tanto al principio como al final de la maestría, gracias por siempre darme palabras de aliento y darme el último “empujón” que necesitaba para terminar este proyecto que había comenzado.
- A la M.C. María Elena Bello López por sus consejos y por su ayuda durante mi estancia en el laboratorio, por las pláticas y risas mientras trabajábamos por siempre estar dispuesta a ayudarme aunque tuvieras muchos más cosas que hacer o que ya fuera muy noche. Sin duda eres un ejemplo de constancia y dedicación a aquello que nos apasiona.
- A la M.C. Alma López García por esas excelentes clases de bacteriología e Inmunología que sin duda me marcaron e hicieron que decidiera estudiar este posgrado, gracias por haberme ayudado en los campos pulsados a pesar de que tenía mucho trabajo en ese momento, siempre le estaré agradecido.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

❖ A mis padres

José Luis y Luz Gloria

Por su apoyo infinito, por sus consejos y por todo lo que me han dado, gracias por siempre ser un ejemplo a seguir, por enseñarme los valores morales y familiares que son tan necesarios actualmente. Gracias Papa porque nunca me faltó nada, al contrario siempre tuve en abundancia y te lo debo a ti, siempre estás siempre en mi corazón, te extraño muchísimo. Gracias mamá por ser como eres, por ese cariño. Por el cuidado incondicional, por los regaños por ser ese pilar que nos hace seguir adelante y recuerda:

“Porque fuimos salvados en esta esperanza; pero la esperanza que se ve no es esperanza, porque, cuando el hombre ve una cosa, ¿la espera? Pero si esperamos lo que no vemos, seguimos aguardándolo con aguante” (Romanos 8:24 -25)

❖ A mis hermanos

Paola

Gracias por ser tan buena hermana, por ser mi amiga, por cuidarme, por ser un ejemplo de amor, de perseverancia, de bondad y de entrega, no puedo pedir una hermana mejor porque la tengo y estoy muy orgulloso de ti.

Luis

Gracias por ser un buen hermano, y por estar pendiente de mi mamá y de nosotros, eres un buen padre estoy seguro de que Ángel y Diego te están agradecidos por todo el amor que les das.

❖ A mis amigos

Verónica

Gracias por ser mi confidente por tener el mismo sentido raro del humor, por reírte de mis ocurrencias y por siempre echarme ánimos, gracias por realmente escucharme, por siempre estar en los peores momentos, por solaparme pero también por hacerme ver cuando estoy equivocado, me gane el cielo al tenerte como mi mejor amiga.

Giselle y Karen

Gracias por haberme adoptado en su hogar y siempre ser tan bondadosas conmigo, gracias por tantos años de amistad y por tanta ocurrencia, he aprendido mucho de ustedes a nivel personal y profesional, las quiero mucho y les estaré eternamente agradecida por todo.

A mis amigos Ana María, Karen, Javier, Maricruz, Pavel, Arturo, que por alguna u otra razón la vida ha hecho que tomemos caminos diferentes, siempre están en mi corazón y estoy al tanto de ustedes, gracias por todos los momentos que hemos compartido

❖ **A mis compañeros de Laboratorio**

A Angélica y Yesenia por los momentos de convivencia y por las pláticas y risas de horas, gracias por siempre darme ánimos para seguir adelante, son muy buenas amigas.

A mis chicas y amigas Brenda y Doris, por hacerme divertido el curso de genética con tanta ocurrencia, por las risas y fiestas y por siempre darme ánimos para seguir adelante.

A Flor por siempre sacarme el tema de conversación ya sea de videojuegos o el reality de televisión que veíamos los cuales hacían ameno nuestro trabajo en el laboratorio.

A mis demás compañeros Daisy, Edwin, Jessi, Nora, Francisco, Miranda, Eder, Marco y Cesar por hacer que el ambiente del laboratorio fuera armonioso y divertido.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
Introducción.....	12
Antecedentes.....	22
Justificación.....	24
Objetivos.....	25
Diagrama de trabajo.....	26
Material y Métodos.....	27
Resultados.....	45
Discusión.....	61
Conclusiones.....	67
Perspectivas.....	68
Referencias.....	70
Anexos.....	74

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura	Tabla	Titulo	Pagina
1		Estructura química y clasificación de los antibióticos β -lactámicos e inhibidores de las β -lactamasas	13
2		Mecanismo de acción de los β -lactámicos	14
3		Mecanismo de Acción de las β - lactamasas	15
4		Esquema que engloba los dos sistemas de clasificación de las β -lactamasas	16
5		Estructura básica de las quinolonas, ácido 4-quinolín-3-carboxílico	18
6		Mecanismos de resistencia cromosómicos y plasmídicos a quinolonas	20
	1	Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de muestras clínicas	28
7		Sitios de corte de la enzima XbaI	31
	2	Criterios para el análisis de patrones PFGE- <i>XbaI</i>	32
	3	Oligonucleótidos empleados en la amplificación de genes de resistencia	34
	4	Volúmenes y concentraciones de la mezcla de reacción empleadas en las PCRs.	35
	5	Oligonucleótidos empleados en la amplificación de genes de resistencia a quinolonas.	36
	6	Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de los productos esperados de cada gen en las reacciones de PCR para determinar los filogrupos de cepas de <i>Escherichia coli</i>	38
8		Amplificados esperados en la PCR cuádruplex y filogrupo asignado	39
	7	Criterios de asignación filogenética.	40
	8	Oligonucleótidos empleados en la búsqueda de patotipos.	41
	9	Oligonucleótidos empleados en la búsqueda de replicones plasmídicos.	43
	10	Cepas aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla, durante el periodo de septiembre de 2015 a abril de 2016.	45
	11	Fenotipo de Resistencia y producción fenotípica de BLEE	50
9		Perfil de PFGE de aislados clínicos de <i>Escherichia coli</i> del Hospital Regional ISSSTE de la ciudad de Puebla	52
10		Dendograma UPGMA elaborado mediante el programa NTSYS pc 2.21q software	53
	12	Serotipo de las 26 cepas estudiadas de <i>Escherichia coli</i> .	58
	13	Características fenotípicas y genotípicas de las 26 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla	65

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico	Título	Página
1	Servicio de procedencia de las 30 cepas de <i>E. coli</i> del hospital regional ISSSTE de Puebla	47
2	Origen de aislamiento de las 30 cepas de <i>E. coli</i> del hospital regional ISSSTE de Puebla.	47
3	Perfil de susceptibilidad a los antibióticos ensayados de las diferentes familias en las 30 cepas de <i>E. coli</i> aisladas en pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla	48
4	Porcentaje de efecto positivo (sinergismo) de las 30 cepas de <i>E. coli</i> del Hospital Regional ISSSTE de Puebla, a los antibióticos ensayados en la prueba de difusión con doble disco en la producción de BLEE	49
5	Amplificación mediante PCR de los genes codificantes para BLEE en las 26 cepas de <i>E. coli</i> multidrogorresistentes, aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.	55
6	Amplificación mediante PCR de los genes codificantes para resistencia a quinolonas en las 26 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.	56
7	Amplificación mediante PCR de los fragmentos de las islas de patogenicidad de 3 cepas características de UPEC (CFT073, J96 y 536) de las 26 cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.	57
8	Porcentaje de cepas pertenecientes a cada uno de los filogrupos encontrados de las 26 cepas de <i>E. coli</i>	59
9	Porcentaje de cepas pertenecientes a cada uno de los replicones plasmídicos encontrados de las 26 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>acc(6')-Ib-cr</i>	Gen que codifica para la acetilasa Acc(6')-Ib-cr
AMP	Ampicilina
AMC	Amoxicilina con Ácido Clavulánico
AN	Amikacina
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (siglas en inglés)
ATM	Aztreonam
BET	Bromuro de Etidio
BHI	Medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón
BLAST	Herramienta básica de búsqueda para alineamientos locales
BLEE	β -Lactamasa de Espectro Extendido
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CICM	Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínico (siglas en inglés)
CTX	Cefotaxima
CTX-M	β -lactamasa derivada de la contracción "Cefotaximasa aislada en Munich"
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i> ,	y colaboradores
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
GM	Gentamicina
<i>gyrA</i>	Gen que codifica para la girasa bacteriana
IPM	Imipenem
LIA	Agar Hierro Lisina
MC	Medio de cultivo Mac Conkey
MEM	Meropenem
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MIO	Medio de Movilidad Indol Ornitina
mM	Milimolar
MRVP	Medio de Rojo de Metilo – Voges Proskauer
NA	Ácido Nalidíxico
NaCl	Cloruro de Sodio
OMS, WHO	Organización Mundial de la Salud, (siglas en inglés)
OXA	β -lactamasa derivada de la contracción de: " β -lactamasa que otorga resistencia a Oxacilina"
<i>parC</i>	Gen que codifica para la topoisomerasa IV
PBP	Proteínas de Unión a Penicilina (siglas en inglés)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial Hidrógeno
pI	Punto Isoeléctrico
pM	Picomol o Picomolar

<i>qepA</i>	Gen que codifica para la bomba QepA
<i>qnrA</i>	Gen que codifica para la proteína QnrA
<i>qnrB</i>	Gen que codifica para la proteína QnrB
<i>qnrS</i>	Gen que codifica para la proteína QnrS
rpm	Revoluciones por minuto
S	Estreptomicina
SHV	β -lactamasa derivada de la contracción "Sulfhidril Variable"
SXT	Trimetoprim con Sulfametoxazol
TE	Tetraciclina
TEM	β -lactamasa derivada de la contracción del nombre griego "Temoniera"
Tris-HCl	Tris - Ácido Clorhídrico
TSA	Medio de cultivo Soya Trypticaseína
TSI	Agar Hierro Triple Azúcar
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidad Formadora de Colonia
μg	microgramo
μL	microlitro

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS Y QUINOLONAS EN CEPAS CLÍNICAS DE *Escherichia coli*.

La lista de prioridad global de la OMS de bacterias resistentes a antibióticos dictamina el estudio de las Enterobacterias resistentes a Carbapenémicos y a Cefalosporinas de 3era generación y productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). *Escherichia coli* es un comensal del tracto intestinal pero también puede actuar como un patógeno provocando cuadros de diarrea e infecciones de vías urinarias y meningitis. Estas cepas son capaces de generar resistencia a múltiples familias de antibióticos sobre todo a los β -lactámicos y quinolonas que son de las primeras opciones de tratamiento para estas infecciones. En este estudio se incluyeron 36 cepas de aisladas de pacientes con diferentes patologías provenientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla, México. En estas cepas se ensayó la sensibilidad a 18 antimicrobianos de diferentes familias por el método de Kirby-Bauer (CLSI, 2017) y se realizó la detección fenotípica de la producción de BLEE mediante la prueba de difusión con doble disco. Además, se realizó PFGE para determinar la relación clonal de estas cepas y aquellas que resultaron multidrogoresistentes se caracterizaron genotípicamente mediante la amplificación de los genes codificantes para la producción de BLEE, así como los genes plasmídicos responsables de la resistencia a quinolonas y se determinó el patotipo, serotipo, grupo filogenético, así como la caracterización plasmídica parcial mediante grupos de incompatibilidad (PBRT).

Se identificaron 30 cepas de *E. coli* por caracterización bioquímica. El antibiograma detectó multiresistencia en el 86.6% (26/30) de las cepas; el número de cepas resistentes a los β -lactámicos fue por arriba del 80 %, para 6 antibióticos: AMP, CTX, CRO, ATM, CAZ y FEP, de igual manera que para las quinolonas NA y CIP. El análisis por PFGE mostró que existe una amplia diversidad de clonas. De las 30 cepas de *E. coli*, se seleccionaron 26 (86.6%), las cuales tuvieron un fenotipo de multiresistencia, de estas cepas, 13 (50%) amplificaron el gen de la *bla*_{CTX-M15}. Para los demás genes de las principales β -Lactamasas, 3 cepas amplificaron el gen *bla*_{TEM} (11.5%); 17 cepas el gen *bla*_{OXA} (65.3%) y ninguna cepa dio positivo para la amplificación del gen *bla*_{SHV}. Para los genes de resistencia plasmídica a quinolonas, ninguna cepa amplificó para los genes *qnrA* y *qnrS*; 4 cepas (15.3%) amplificaron el gen *qnrB*, 4 cepas (15.3%) el gen *acc (6')-Ib* y ninguna cepa amplificó los genes *qepA*, *oqxA* y *oqxB*. De estas 26 cepas, cinco amplificaron para las dos islas de patogenicidad de la cepa PAI-CFT073 (que corresponde a una cepa de UPEC, la cual fue aislada de la sangre y orina de una paciente con pielonefritis. A las 26 cepas se les determinó el grupo filogenético obteniendo que 9 cepas (34.6%) correspondieron al grupo filogenético B2, 4 cepas (15.38%) al filogrupo D, 3 cepas (11.5%) al filogrupo F, 2 cepas (7.69%) al filogrupo B1, 2 cepas (7.69%) al filogrupo A, 2 cepas (7.69%) pertenecen a los clados I o II de *E. coli*. En las 26 cepas estudiadas se encontró al menos 9 diferentes replicones plasmídicos identificados por PCR, siendo *IncY* (57.6%), *IncFIB* (30.7%) e *IncFIA* (26.9%) los más prevalentes. Una tercera parte de los aislados clínicos estudiadas (34.6 %) pertenecen al grupo filogenético B2, en el cual se encuentran agrupadas las cepas patógenas de *Escherichia coli*. 3 cepas procedentes del grupo filogenético B2 tuvieron un serotipo O25:H4 lo cual nos puede sugerir la presencia de la clona ST131. En este trabajo se estudiaron los aspectos fenotípicos y genotípicos de aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEE y resistentes a quinolonas, provenientes de diferentes áreas y orígenes de aislamiento de una misma unidad hospitalaria. Los hallazgos aportan información epidemiológica-molecular que podría ayudar al desarrollo de estrategias que ayuden a contener y reducir la resistencia microbiana en esta unidad hospitalaria. Se puso de manifiesto la presencia de cepas de *Escherichia coli* extraintestinales, multidrogoresistentes portadoras de genes BLEE y resistentes a quinolonas tanto en pacientes hospitalizados y de la comunidad. Se puede sugerir que algunas de estas cepas podrían portar estos genes de resistencia en elementos genéticos movilizables por ejemplo plásmidos debido a la presencia de replicones plasmídicos.

Palabras clave: *Escherichia coli*, multidrogo resistencia, BLEE, serotipo O25:H4, Filogrupo B2.

INTRODUCCIÓN

1.-*Escherichia coli*

Es un bacilo gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae* descrita por primera vez por el doctor alemán Theodor von Escherich en 1885. Esta bacteria, es una de las primeras especies bacterianas que coloniza al mamífero recién nacido, a partir del canal de parto y de las heces de su madre. Las colonizaciones posteriores se deben generalmente a la ingestión de alimentos contaminados. Se ha calculado que la densidad de *E. coli* en el intestino grueso de los mamíferos y aves es de uno a diez millones de células por gramo de colon. En individuos sanos, la bacteria actúa como un comensal formando parte de la microbiota intestinal siendo el principal organismo anaerobio facultativo dentro del aparato digestivo y ayudando así a la absorción de nutrientes (Kaper *et al.*, 2004).

La gran plasticidad genómica de *E. coli* le confiere una plasticidad ecológica extraordinaria, permitiéndole adaptarse rápidamente a diferentes ambientes, haciéndola capaz de vivir como un organismo de vida libre o como comensal mutualista del colon en mamíferos y aves.

Adicionalmente, en el interior de sus hospederos puede invadir otros nichos con éxito, y de esta manera llegar a ser un patógeno mortal en humanos y animales, provocando infecciones intestinales con cuadros de diarrea e infecciones extraintestinales, como meningitis, sepsis e infecciones de tracto urinario, siendo el principal agente causal de estas últimas (Souza *et al.*, 2001).

2.-Tratamiento contra las infecciones causadas por *Escherichia coli*.

Los antibióticos β -lactámicos, son los antibióticos de primera elección para el tratamiento de la mayoría de las infecciones por *E. coli*. Estos, desde su introducción en la terapéutica hace ya más de 70 años, representan los agentes antimicrobianos más ampliamente utilizados tanto a nivel nosocomial, como en la comunidad y en la veterinaria (Buynak, 2006). La característica común a todos los miembros de esta familia la determina la presencia de un anillo β -lactámico de cuatro átomos con un enlace amida en su estructura, al que se le unen sustituyentes o cadenas laterales (Suarez *et al.*, 2008).

La asociación de diferentes tipos de cadenas carbonadas, junto con las características propias de este esqueleto básico formado por los 2 anillos (llamado núcleo), modifica las propiedades del compuesto resultante y da lugar a los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos (Figura 1):

- ❖ Penicilinas,
- ❖ Cefalosporinas,
- ❖ Carbapenémicos,
- ❖ Monobactámicos
- ❖ Inhibidores de las betalactamasas

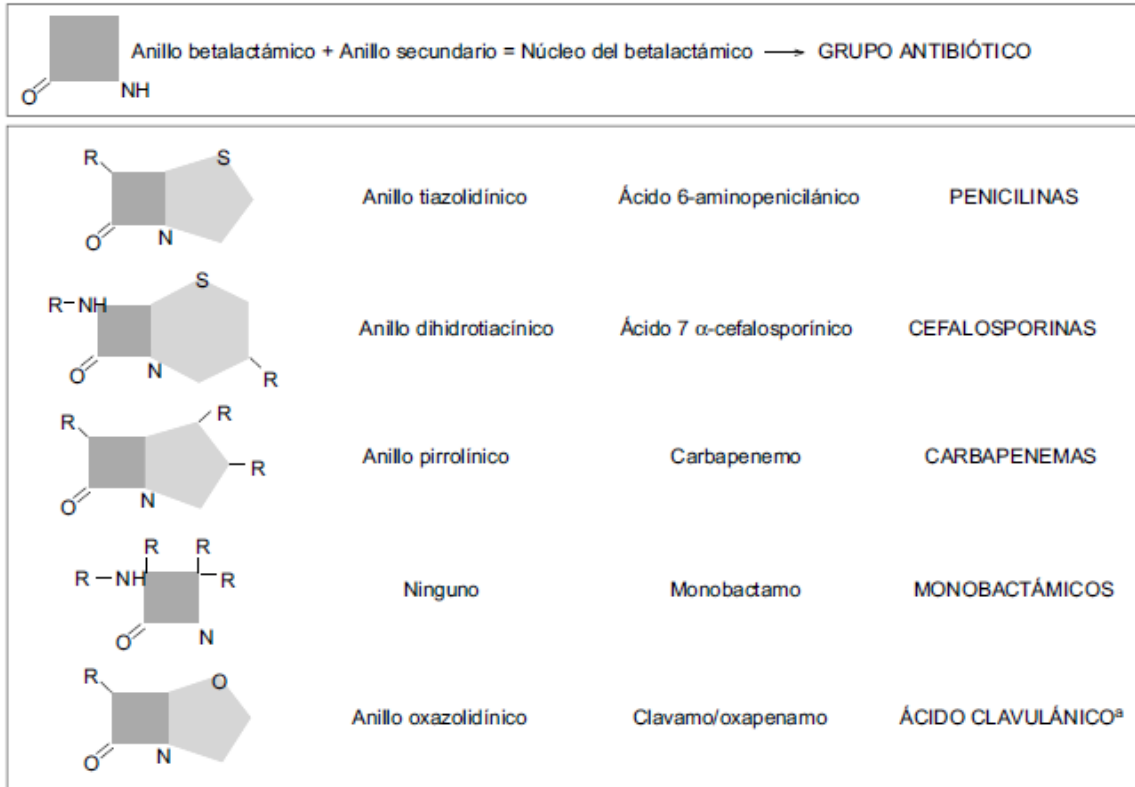


Figura 1. Estructura química y clasificación de los antibióticos β -lactámicos e inhibidores de las β -lactamasas (Suarez, 2008).

Mecanismo de Acción

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto principalmente a través de 2 mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana.

La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos (mediante la pérdida de uno de los aminoácidos terminales) del peptidoglicano, para lo que se necesita la acción de enzimas que se localizan en ese espacio periplásmico, llamadas transpeptidasas. El anillo betalactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular (Figura 2). Es por eso que estas enzimas se llaman también PBP (*penicillin binding*

protein ‘proteína de unión a la penicilina’). Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica. Por tanto, para que actúen los β -lactámicos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que este es el momento en que se sintetiza la pared celular (García *et al.*, 1999).

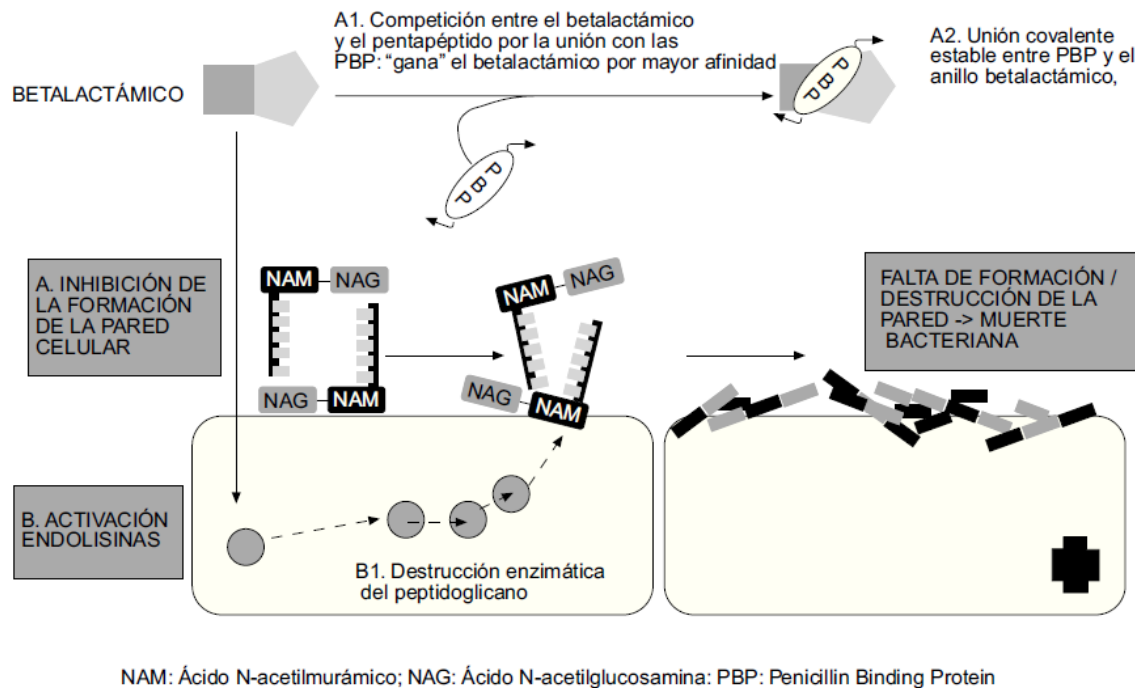


Figura 2. Mecanismo de acción de los β -lactámicos (Suarez, 2008).

2.- Resistencia a los antibióticos

El uso exitoso de cualquier agente terapéutico está comprometido por el desarrollo potencial de tolerancia o resistencia a ese compuesto desde el momento en que se emplea por primera vez (Davies *et al.*, 2010). En el caso de los antimicrobianos, la complejidad de los procesos que contribuyen a la emergencia y difusión de la resistencia no puede ser sobre enfatizada, y la falta de conocimiento sobre estos temas es una de las razones principales por las que el desarrollo de la resistencia a los antibióticos pareciera implacable.

Para el caso de los β -Lactámicos, las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos básicamente mediante 4 mecanismos diferentes que son: cambios en las proteínas PBP, alteraciones en las porinas de la membrana externa, bombas de eflujo e inactivación enzimática del antibiótico por acción de β -lactamasas. En ocasiones, estos

mecanismos pueden ir asociados a otros mecanismos causantes de la resistencia a otras familias de antibióticos (Poole *et al.*, 2001).

Las β -lactamasas hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana (Figura 3). Están codificadas ya sea por genes localizados en el cromosoma o en plásmidos, y su producción puede ser constitutiva o inducible por exposición de la bacteria al antibiótico. Muchos géneros de bacterias Gramnegativas poseen naturalmente en su genoma una β -lactamasa cromosómica. Se sugiere que estas enzimas surgen de proteínas fijadoras de penicilina, con las que muestran una gran homología.

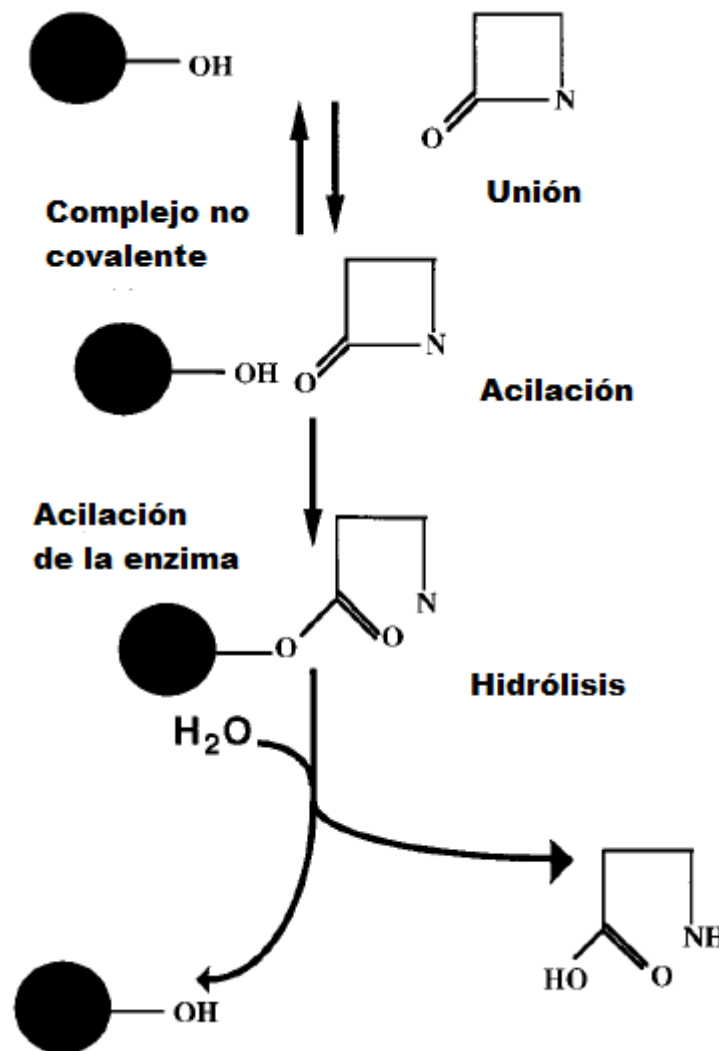


Figura 3. Mecanismo de Acción de las β - lactamasas (Livermore, 1995)

Las β -Lactamasas pueden ser divididas ya sea en las clases A, B, C y D (referida como la clasificación molecular o de Ambler, que se basa en la secuencia de aminoácidos) o en los grupos 1, 2 y 3 (conocida como la clasificación funcional o de Bush-Jacoby, basada en perfiles de sustrato y de inhibición). Las clases A, C, y D necesitan un residuo de serina para tener actividad, por lo que también se conocen como serín β -lactamasas; mientras que las de clase B requieren iones de zinc divalentes, por lo que se denominan metalo β -lactamasas (Figura 4).

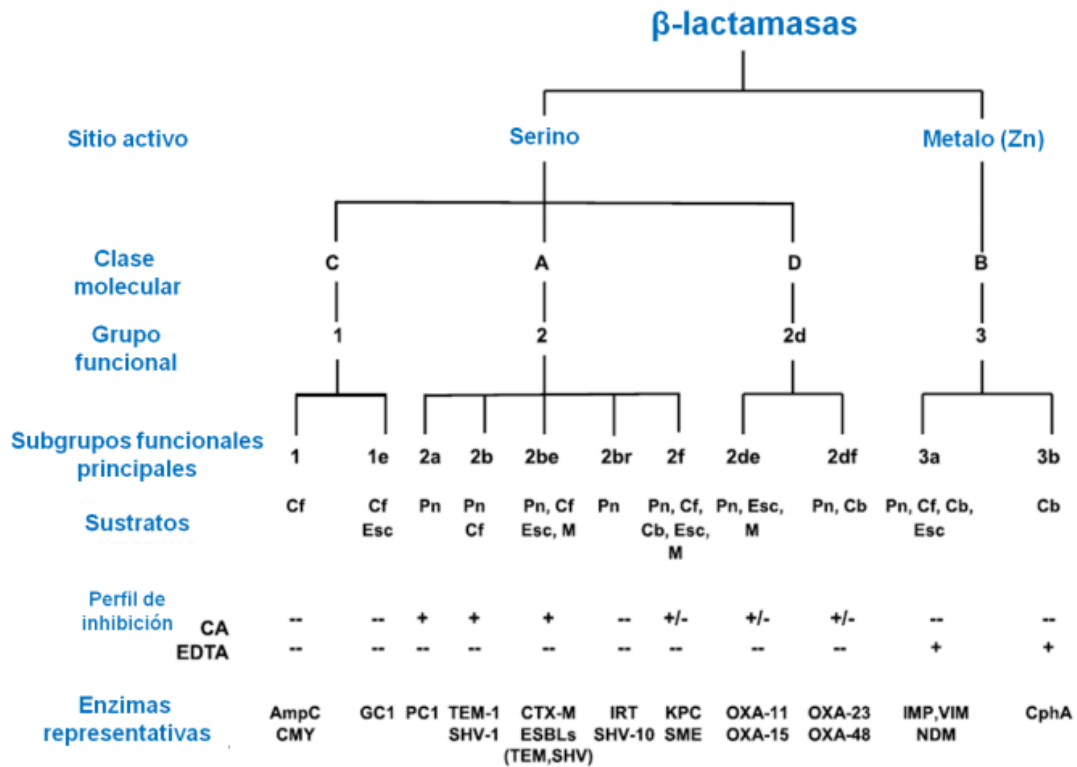


Figura 4. Esquema que engloba los dos sistemas de clasificación de las β -lactamasas (Ambler *et al.*, 1980; Bush *et al.*, 1995).

De esta gran variedad de enzimas, sobresale el grupo de las β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE), el cual ha cobrado gran interés ya que tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE).

La terapia antimicrobiana con oxiiimino-cefalosporinas (como cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima o cefepime) es una de las primeras elecciones para tratar infecciones

causadas por *E. coli*, mientras que la producción de β -lactamasas es la causa más común de resistencia a gran variedad de estos agentes β -lactámicos (Paterson, 2005).

Las BLEE son definidas como enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo a las de tercera y cuarta generación e incluso carbapenémicos; y pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas como el tazobactam y el sulbactam (Ghafourian *et al.*, 2015).

Las BLEE incluyen enzimas pertenecientes a la clase A de Ambler y funcionalmente al grupo 2be y enzimas de la familia de las OXA que pertenecen a la clase D de Ambler y al grupo funcional 2de (Tabla 2) y se clasifican según su secuencia de aminoácidos en diferentes familias.

El grupo 1 hace referencia a serín cefalosporinasas, mientras que al grupo 2 pertenecen las serín β -lactamasas (que incluyen penicilinasas y enzimas de amplio espectro); y al grupo 3 las metalo β -lactamasas (Bush y Jacoby, 2010). Las β -lactamasas de amplio espectro son enzimas con actividad hidrolítica frente a oximiino cefalosporinas y/o carbapenémicos. Estas enzimas incluyen a las β -lactamasas tipo AmpC mediadas por plásmidos (como CMY-2), BLEE de clase A (tipos CTX-M, SHV y TEM). Las BLEE tipo CTX-M son las más ampliamente diseminadas en *E. coli*, ciertas variantes de esta enzima suelen utilizarse como marcador de la presencia de ciertas clonas prevalentes en diferentes nichos ecológicos.

BLEE CTX-M

Las BLEEs tipo CTX-M pertenecen a la clase molecular A o al grupo funcional 2be que incluyen al menos seis linajes: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 CTX-M-25 y KLCU; que difieren entre sí por la homología de su secuencia aminoacídica en un >10%. Cada grupo, a su vez, incluye un número de variantes alélicas menores que difieren entre sí por una o pocas sustituciones de aminoácidos ($\leq 5\%$ de residuos de aminoácidos). Las secuencias de inserción involucradas en la captura y movilización de genes *bla*_{CTX-M} proporcionan fuertes promotores lo que le permite tener altos niveles de expresión (D Andrea *et al.*, 2013).

Los genes *bla*_{CTX-M} adquiridos generalmente son transportados por plásmidos conjugativos; de hecho, la movilización de los genes ha sido muy exitosa, que conduce a una rápida dispersión de estos en prácticamente todos los principales grupos de incompatibilidad de plásmidos que circulan en enterobacterias (Carattoli *et al.*, 2009).

La asociación de plásmidos que codifican CTX-M con exitosos linajes clonales virulentos de *E. coli* ha generado una serie de clonas multiresistentes y virulentas llamadas "de alto riesgo" (Woodford *et al.*, 2011). Los ejemplos más paradigmáticos están representados por la clona pandémica de *E. coli* ST131 (grupo filogenético B2), que ha contribuido enormemente a la difusión mundial de CTX-M-15.

QUINOLONAS

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos de amplio espectro, cuyo “blanco” es la síntesis del ADN y que representan una familia de antibióticos muy comúnmente utilizados para el tratamiento de enfermedades provocadas por *E. coli*. Se han utilizado ampliamente para el tratamiento de infecciones intra y extra-hospitalarias, convirtiéndose en un recurso de suma importancia para países en vías de desarrollo debido a la gran disponibilidad de genéricos que reducen drásticamente el costo del tratamiento (Álvarez *et al.*, 2015).

Derivan de una estructura básica, el ácido 4-quinolín-3-carboxílico (4-quinolona) (Figura 5). Desde la obtención de la primera quinolona, el ácido nalidíxico (Leshner, 1962) hasta nuestros días, se han obtenido y descrito un gran número de compuestos incluidos en esta familia de antibióticos.

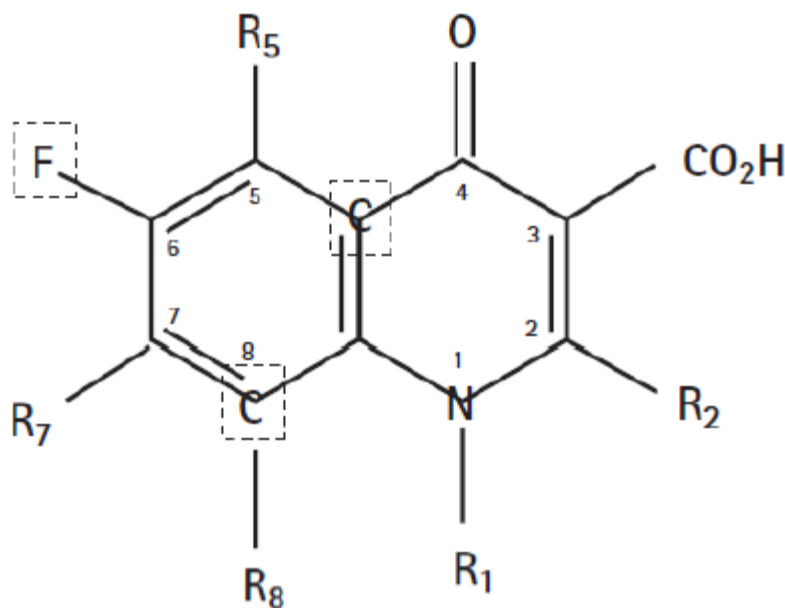


Figura 5. Estructura básica de las quinolonas, ácido 4-quinolín-3-carboxílico (Leshner, 1962).

Mecanismo de acción

El blanco específico de las quinolonas es interferir en la síntesis del ADN, conduciendo a muerte celular bacteriana mediante la fragmentación cromosómica.

Penetran la pared celular a través de porinas, inhibiendo directamente la replicación bacteriana al interactuar con dos enzimas: ADN girasa (proteína tetramérica compuesta por dos pares de subunidades A y B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (proteína tetramérica compuesta por dos pares de subunidades A y B, codificados por los genes *parC* y *parE*), las cuales son necesarias para realizar el superenrollamiento del ADN.

Específicamente, ADN girasa es el blanco primario en bacterias Gramnegativas, mientras que topoisomerasa IV lo es en bacterias Grampositivas. Algunas quinolonas con espectro de actividad y potencia mejorada, parecen tener como blanco ambas enzimas (Maruri *et al.*, 2012).

Resistencia bacteriana a quinolonas

De igual manera que a los β -lactámicos, las bacterias también han desarrollado mecanismos de resistencia ante este grupo de antibióticos. Hasta el momento, se han establecido dos tipos de mecanismos de resistencia a quinolonas: a) mecanismos cromosómicos y b) mecanismos de resistencia mediados por plásmidos. Los mecanismos cromosómicos están originados bien por alteraciones en las enzimas diana de las quinolonas o por una disminución de la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria, pudiendo deberse este hecho tanto a una disminución en la permeabilidad de la bacteria como a una sobreexpresión de bombas de eflujo capaces de expulsar al antibiótico al exterior. El hecho de tratarse de mecanismos cromosómicos implica que su transferencia a otros microorganismos es vertical, es decir, se transfiere a las células hijas tras la duplicación del cromosoma bacteriano.

Por otro lado, durante décadas la resistencia bacteriana a estos antibióticos había sido atribuida a mutaciones cromosómicas; sin embargo, en 1998 un grupo de investigadores españoles y americanos, describió por primera vez la resistencia a quinolonas mediada por un plásmido (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). El gen responsable de esta resistencia fue denominado *qnr* (de *quinolone resistance*) y a partir de entonces fueron surgiendo nuevas variantes de dicho gen, así como diferentes mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas, tales como la enzima aac (6')-Ib-cr o la bomba de eflujo QepA (Martínez-Martínez *et al.*, 2008) y más recientemente, las bombas de eflujo OqxA y OqxB (Sorensen *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009) (Figura 6).

Los plásmidos pueden clasificarse por varios criterios, tales como: su tamaño, su número de copias, el rango de hospedero, el tipo de genes que contiene o en base a su grupo de incompatibilidad (Inc) (Cantón *et al.*, 2012); se dice que si dos plásmidos son incapaces de coexistir en la misma bacteria, pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad.

Los plásmidos ligados a la resistencia antimicrobiana se pueden dividir en 2 grupos principales:

- 1) Estrecho rango de hospedero, al cual pertenecen los del grupo de incompatibilidad F (IncF).
- 2) Amplio rango de hospedero, al que pertenecen los plásmidos IncA/C, IncL/M e IncN.

Estos últimos pueden ser fácilmente transferidos entre diferentes especies bacterianas, mientras que los de reducido rango de hospedero tienden a estar restringidos a ciertas especies (Carattoli, 2009; Carattoli *et al.*, 2014).

Los plásmidos epidémicos de resistencia pertenecen en su mayoría al grupo IncF con replicones divergentes (FIA, FIB y FII), así como a IncN e IncK con ciertas secuencias de inserción (IS) como *ISEcp1* o *ISCR1*, que son capaces de movilizar, por ejemplo, a genes *bla_{CTX-M}* entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (D'Andrea *et al.*, 2013). Así mismo, estos plásmidos tienen la capacidad de adquirir genes de resistencia y diseminarse rápidamente entre las enterobacterias, particularmente entre algunas clonas específicas como *E. coli* ST131 (Carattoli, 2009).

ANTECEDENTES

La resistencia bacteriana es un fenómeno cada vez más evidenciado en diferentes ambientes, pero fue en bacterias de origen clínico donde se describieron los primeros mecanismos de resistencia. Se ha visto que en el ambiente clínico la diseminación de genes de resistencia entre bacterias patógenas es muy elevada y extremadamente fácil, incluso propagándose a otros ambientes, por lo que cepas multidrogorresistentes se aíslan ya no solo en muestras clínicas de humanos, sino también de animales, agua y alimentos, por mencionar algunos nichos ecológicos.

A lo largo de los últimos años se han reportado gran variedad de trabajos sobre mecanismos de resistencia, específicamente sobre la producción de BLEE y genes de resistencia a quinolonas codificados en plásmidos en cepas de enterobacterias de origen clínico.

Algunos datos registrados por el *European Antimicrobial Surveillance System* (EARSS) que se encarga de monitorizar las resistencias antibióticas en patógenos invasivos desde 1998, muestran un aumento en la frecuencia de *E. coli* resistente a cefalosporinas de 3ª generación en Europa entre 2006 y 2008. En la mayor parte de Europa la prevalencia de *E. coli* conteniendo BLEE está entre el 1-5%, siendo algo más alta en España, donde según los últimos datos oscila entre el 5-10% (Livermore, *et al.*, 2007).

En el 2009 Kim y colaboradores reportaron el primer caso de la presencia de genes que codifican para las bombas de expulsión *Oqxa* y *Oqxb* en *E. coli* proveniente de seres humanos (Kim *et al.*, 2010).

En 2010 Lautenbach y colaboradores identificaron cepas de *E. coli* provenientes de heces de pacientes hospitalizados en EE.UU., 353 cepas mostraron sensibilidad disminuida hacia fluoroquinolonas, teniendo el 85 % una o más mutaciones a nivel de *gyrA* y 46 % una o más mutaciones a nivel de *parC* (Lautenbach *et al.*, 2010).

En Bélgica Smet y colaboradores demostraron la presencia de la BLEE CTXM-15 en más del 50 % de una colección de 135 cepas de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas y aminoglucósidos, obtenidas de pacientes hospitalizados y de la comunidad. (Smet *et al.*, 2010)

En 2011 Elgorriaga y colaboradores identificaron la presencia de determinantes plasmídicos de resistencia a quinolonas principalmente ella presencia del gen *aac(6)-Ib-cr* en 74% de aislados de *E. coli* productora de BLEE en 10 diferentes hospitales de Chile. (Elgorriaga *et al.*, 2011).

En 2012 el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México reportó en una serie de 115 pacientes inmunosuprimidos por leucemia que el 34% de los hemocultivos

positivos a *E. coli* productoras de BLEE. De esta población 56 aislamientos de *E. coli*-BLEE fueron caracterizados por análisis molecular, encontrando la expresión de CTX-M-15 en el 84% de las cepas. En este estudio se demostró que la hospitalización previa aunada al uso de cefalosporinas en el mes previo al aislamiento de la *E. coli*-BLEE fueron factores de riesgo para el desarrollo de bacteremia por este microorganismo (Cornejo-Juárez *et al.*, 2012).

En 2013 Rakotonirina y colaboradores identificaron 49 cepas productoras de BLEE tipo CTX-M15 y OXA1 portadoras de genes de resistencias plasmídicos a quinolonas como *qnrA*, *qnrB* y *gen aac(6)-Ib-cr* de un total de 100 aislados procedentes de 4 diferentes hospitales de la región de Antananarivo, Madagascar (Rakotonirina *et al.*, 2013).

En un trabajo comunitario realizado a 3344 participantes en Alemania, Valenza y colaboradores detectaron en 211 personas colonizadas por *E. coli* BLEE, la mayoría de estas cepas tuvieron BLEE perteneciente al tipo enzimático CTX-M (46% CTX-M-15 y 24% CTX-M-1); sin embargo, también encontraron cepas de *E. coli* productoras de carbapenemasas tipo OXA-244, lo que indica un riesgo elevado para la transmisión de cepas multiresistentes en la comunidad (Valenza *et al.*, 2014).

En 2010, en México, Rocha y colaboradores reportaron por primera vez una cepa de *E. coli* (C1550) de origen clínico con resistencia plasmídica a quinolonas con el gen *qepA*. Esta cepa mostró un fenotipo de multiresistencia y fue positivo a la producción de BLEE. Se detectaron genes que codifican para las β -lactamasas CTX-M15 y TEM-1b, posteriormente se obtuvieron bacterias transconjugantes de la cepa, que mostraron incrementos de 36 a 40 veces más en la concentración mínima inhibitoria (CMI) hacia ciprofloxacino y levofloxacino. Se demostró que la cepa que contenía el gen *qepA* estaba incluido un plásmido conjugativo de tipo Inc-F (Rocha-Gracia *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de primera elección para las infecciones causadas por algunos patotipos de *Escherichia coli* es el uso de antibióticos β -lactámicos y quinolonas; sin embargo, la resistencia a estos grupos de antibióticos se ha incrementado en los últimos años a nivel mundial.

Para *E. coli*, el mecanismo más común de resistencia a antibióticos β -lactámicos es la producción de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE), mientras que para quinolonas existen mecanismos cromosómicos y plasmídicos que disminuyen la acción del fármaco. La transferencia y co-transferencia de genes de resistencia plasmídicos hacia otras cepas agrava el problema, lo que ha dado lugar a cepas multidrogoresistentes, cuya resistencia varía de acuerdo a la zona geográfica e incluso entre hospitales de la misma zona, ya que se ve influenciada por el uso y abuso de los antimicrobianos dentro y fuera de los hospitales.

Por tal motivo, la caracterización de los mecanismos moleculares de resistencia en cepas de *E. coli* a nivel local constituye la base para la determinación del tratamiento de elección que puede variar dependiendo de la epidemiología de la zona geográfica.

OBJETIVOS

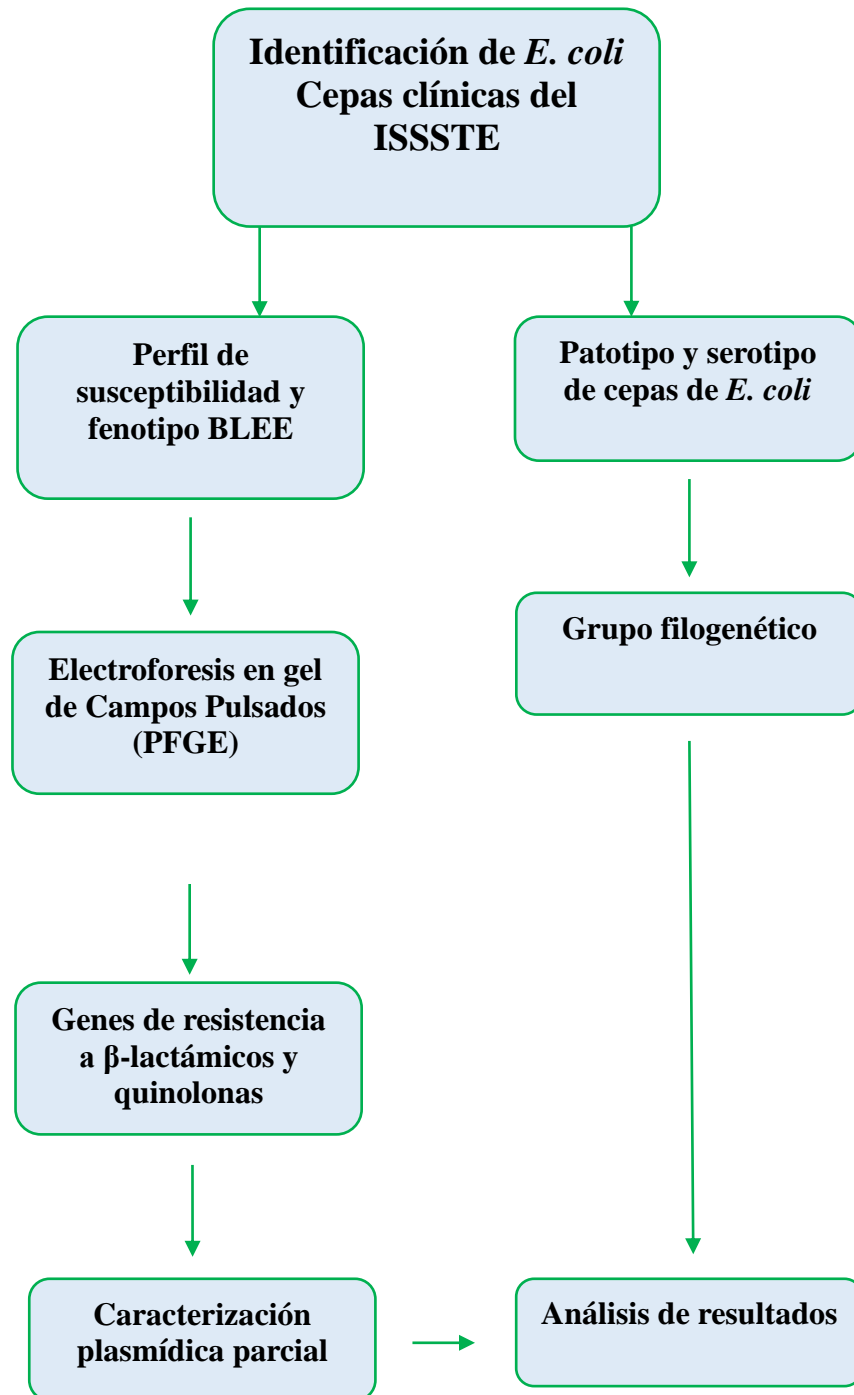
General

Estudiar el fenotipo y genotipo de la resistencia mediada por β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE), así como de los mecanismos de resistencia cromosómicos y plasmídicos a quinolonas, en cepas clínicas de *Escherichia coli*.

Específicos

1. Determinar el perfil de susceptibilidad hacia antibacterianos de diferentes familias, en cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas.
2. Determinar fenotípicamente la producción de BLEE.
3. Determinar la relación clonal de cepas clínicas de *E. coli* (por medio de electroforesis en gel de campos pulsados).
4. Identificar genes que codifican la producción de BLEE tipo CTX-M grupo I y 9, TEM, SHV, AmpC y OXA-1 en los aislamientos mediante PCR y secuenciación.
5. Identificar genes que codifican para resistencia plasmídica y cromosómica a quinolonas, en cepas clínicas de *E. coli*, mediante PCR y secuenciación.
6. Determinar el patotipo y serotipo de las cepas clínicas de *E. coli* resistentes a β -lactámicos y quinolonas.
7. Determinar el grupo filogenético de las cepas clínicas de *E. coli*, y resistentes a β -lactámicos y quinolonas.
8. Realizar la caracterización plasmídica parcial en algunas cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE y resistentes a quinolonas.

DIAGRAMA DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS

Identificación Bioquímica de cepas de *Escherichia coli*

Se recibieron 36 cepas procedentes de muestras clínicas de diferentes orígenes aisladas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional del I.S.S.S.T.E, Puebla, que provenían de pacientes tanto hospitalizados como ambulatorios con algún proceso infeccioso, aisladas durante el periodo septiembre de 2015 a abril de 2016.

Las cepas se registraron con un número consecutivo en el cepario interno del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad-CICM, anotando los datos de cada cepa; posteriormente se sembraron por estría cruzada en placas de agar TSA (Difco®) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Posteriormente, se tomó una colonia del crecimiento y se procedió a realizar la identificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas con las indicaciones del método de Cowan y Steel (Barrow, 2004), específicas para Enterobacterias: Agar Hierro Lisina (LIA), Movilidad Indol Ornitina (MIO), Agar Hiero Triple Azúcar (TSI), Citrato (CIT), Fenilalanina (FEN), Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MRVP) y Urea de Christensen (URE) (Anexo 1). Los resultados se compararon con los esquemas de identificación señalados por Cowan y Steel en el manual de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica de MacFaddin (MacFaddin, 2003), utilizando la clasificación taxonómica propuesta en la 2° edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner *et al.*, 2005).

De las 36 cepas recibidas, solo 30 se identificaron como *Escherichia coli*, las cuales se sembraron de forma masiva en placas de agar TSA (Bioxon ®) y después de incubarlas 18 horas a 37 °C, se recolectó todo el crecimiento y se resuspendió en viales de 1 mL con caldo BHI (Bioxon ®) adicionado con glicerol (Bio-Rad ®) al 10% (vol/vol); por último se guardaron a -70 °C para su posterior utilización.

Condiciones éticas: Las cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla fueron recolectadas de forma rutinaria, y los datos de los pacientes se mantuvieron en anonimato. El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de enseñanza y ética del hospital con el número 188.2018

Determinación del perfil de susceptibilidad

El perfil de susceptibilidad se realizó mediante el método de Kirby-Baüer hacia 18 antimicrobianos pertenecientes a las familias de antibióticos β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, inhibidores de la vía de folato y fenicoles, recomendados por el CLSI 2017 (Tabla 1).

Tabla 1. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras clínicas.

			Halo de inhibición (mm) y criterio de interpretación			
Grupo o Familia	Antimicrobiano	Concentración (μ g)	S	SSD	I	R
β -lactámicos	Ampicilina (AM)	10	≥ 17	-	14-16	≤ 13
	Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC)	20 o 10	≥ 18	-	14-17	≤ 13
	Cefoxitina (FOX)	30	≥ 18	-	15-17	≤ 14
	Cefotaxima (CTX)	30	≥ 26	-	23-25	≤ 22
	Ceftriaxona (CRO)	30	≥ 23	-	20-22	≤ 19
	Cefepime (FEP)	30	≥ 25	19-24	-	≤ 18
	Ceftazidima (CAZ)	30	≥ 21	-	18-20	≤ 17
	Aztreonam (ATM)	30	≥ 21	-	18-20	≤ 17
	Imipenem (IMP)	10	≥ 23	-	20-22	≤ 19
	Meropenem (MEM)	10	≥ 23	-	20-22	≤ 19
Aminoglucósidos	Gentamicina (GM)	10	≥ 15	-	13-14	≤ 12
	Amikacina (AMK)	30	≥ 17	-	15-16	≤ 14
	Estreptomina (S)	10	≥ 15	-	12-14	≤ 11
Quinolonas	Ciprofloxacino (CIP)	30	≥ 21	-	16-20	≤ 15
	Ácido Nalidíxico (NAL)	5	≥ 19	-	14-18	≤ 13
Tetraciclinas	Tetraciclina (TET)	30	≥ 15	-	12-14	≤ 11
Inhibidores de la vía folato	Trimetoprim con Sulfametoxazol (SXT)	1.25/23.75	≥ 16	-	11-15	≤ 10
Fenicoles	Cloranfenicol (C)	30	≥ 18	-	13-17	≤ 12
Polimixinas	Colistina (COL)	10	≥ 11	-	-	≤ 10

Los puntos de corte se interpretaron de acuerdo al CLSI, versión 2017.

S: Sensible. SDD: Susceptibilidad dosis dependiente, I: Intermedio; R: Resistente

➤ Procedimiento

De un cultivo de 18 a 24 horas en agar TSA, se seleccionó una colonia (se eligieron solo colonias bien aisladas para evitar pruebas de cultivo mixto), se recogió de la placa con un asa bacteriológica y se colocó en un tubo con 5 mL de solución salina isotónica (SSI) al 0.85% (masa/volumen) de NaCl (anexo 2), agitando para resuspender el inóculo. Posteriormente se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana con un estándar, de tal manera que se alcanzara un valor de 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL. Después se impregnó un hisopo de algodón estéril con la suspensión y se inocularon placas de agar Müeller Hinton (Bioxon ®), empezando en la parte superior de la placa deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme, de tal manera que el crecimiento fuera en forma de “césped bacteriano”

Una vez inoculadas las placas se colocaron los sensidiscos impregnados con los antibióticos (Bio-Rad ®), esto se hizo con ayuda de una pinza estéril presionando ligeramente para asegurar el contacto con la superficie, se colocaron 7 discos por placa. Después de 15 minutos de haber colocado los discos, se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C por un lapso de 18 a 24 horas. Finalmente se midieron los halos de inhibición y se compararon con los valores establecidos para Enterobacterias del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) (Tabla 1), con los cuales se determinó si las cepas eran sensibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos. En caso de no haber halo de inhibición, se consideró un valor de 6 mm que corresponde al diámetro del sensidisco. La prueba se realizó utilizando como control a la cepa *E. coli* ATCC611, que es sensible a todos los antibacterianos evaluados.

Producción fenotípica de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

La identificación fenotípica de las BLEE se realizó mediante la prueba de difusión con doble disco (Jarlier *et al.*, 1988), que se basa en el hecho de que las BLEE son inhibidas por el Ácido Clavulánico, Sulbactam y Tazobactam, por lo que al colocar un disco impregnado de un antibiótico β -lactámico a una distancia de 2 a 2.5 cm de otro impregnado con algún inhibidor, se produce un sinergismo entre el inhibidor de la β -lactamasa y el antibiótico, debido a que como la estructura del inhibidor es muy semejante a la del antibiótico, la β -lactamasa se une irreversiblemente al inhibidor, dejando así actuar al antibiótico sin que se hidrolice. La presencia de una BLEE se aprecia observando la formación de una “cola de pescado”, o simplemente una prolongación del halo de inhibición, entre el disco del inhibidor y el del antibiótico β -lactámico evaluado.

➤ Procedimiento

El método se realizó de la misma manera que un antibiograma convencional, es decir, de un cultivo de 18 a 24 horas en agar TSA, se seleccionó una colonia y se resuspendió en

un tubo con 5 mL de SSI al 0.85% (masa/volumen) de NaCl. Posteriormente se ajustó la turbidez a 0.5 de la escala de McFarland y se impregnó un hisopo de algodón estéril con la suspensión para sembrar en placas de agar Müeller Hinton, empezando en la parte superior de la placa deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme, en forma de “césped bacteriano”.

Después se colocaron los sensidiscos de antibióticos, situando un disco de Amoxicilina/Ácido Clavulánico (concentración de 20/10 µg) a una distancia de 2 cm de discos con carga estándar (30 µg) de Cefotaxima, Ceftazidima, Cefepime y Aztreonam. 15 minutos después se invirtieron las placas y se incubaron de 18 a 24 horas a 37 °C. Finalmente se observó la presencia o no del sinergismo. La prueba se realizó utilizando como control a la cepa *E. coli* C1550 (Rocha-Gracia *et al.*, 2010) que da un efecto positivo de sinergismo para los antibióticos Aztreonam, Cefotaxima y Ceftazidima.

Nota: Este método se aprovechó para medir los halos de inhibición de los antibióticos involucrados, mismos que no se incluyeron en la prueba de Kirby-Baüer.

Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

Esta técnica se utilizó con el fin de determinar la relación poblacional de las cepas en base a un patrón de restricción generado por la endonucleasa *XbaI*. Se siguió el protocolo propuesto por Gautom y colaboradores (Gautom *et al.*, 1997), brevemente modificado por Elena Ruiz (Ruiz *et al.*, 2012) como se indica a continuación:

Preparación de los insertos:

A partir de un cultivo puro crecido durante 24 h en agar BHI, se realizó una suspensión en 1 ml de *Buffer SE* (75mM NaCl y 25mM EDTA, pH 8) hasta conseguir una absorbancia de 1.35-1.5 a 610 nm. Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad®) al 1.5% en tampón *TE* (10mM Tris y 1mM EDTA) y se mantuvo a 54°C. Se mezclaron 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 0.5 ml de agarosa y se distribuyó en moldes con lo cual quedan preparados los insertos. Se dejaron solidificar unos minutos en refrigeración. Preparación de soluciones ver anexo 3

Lisis bacteriana:

Se emplearon 3 insertos por cepa, a los que se añadieron 3 ml de *Buffer de lisis* [50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8; 1% sarcosil; 0.1 mg/ml proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®)] y se dejó incubar durante 24 h en baño María a 54°C.

Lavado de los insertos:

Tras eliminar el *Buffer de lisis*, se realizaron los siguientes lavados en baño María a 54°C, agregando:

- ✓ 3 ml de agua destilada estéril cada 10 min, tres veces.
- ✓ 3 ml de *Buffer TE* cada 10 min, dos veces.
- ✓ 3 ml de *Buffer TE* a temperatura ambiente, una vez.

Los insertos se conservaron en 3 ml de *Buffer TE* a 4°C hasta su utilización.

Digestión enzimática:

Se digirió medio inserto de cada cepa con la enzima *XbaI* (Thermo Fisher Scientific®), generando fragmentos de acuerdo a los sitios de corte específicos (Figura 7). El volumen final del tampón de digestión fue de 100 µl por tubo, a los que se les añadió 40 U de enzima *XbaI* (New England, Biolabs), 10 µl de Buffer 10X de la enzima y agua miliQ estéril. La mezcla y el inserto se incubaron durante 6 h a 37°C.

Reacción: Enzima <i>XbaI</i> :	2 µl
Buffer 10X:	10 µl
Agua:	88 µl
	<hr/>
Vol. Final:	100 µl



Figura 7. Sitios de corte de la enzima *XbaI* (<https://www.thermofisher.com>).

Análisis de los patrones PFGE-*XbaI*:

Los patrones de digestión fueron inicialmente analizados siguiendo los criterios sugeridos por Tenover y colaboradores, de tal manera que se asignó la misma letra (A-Z) cuando el patrón entre los aislados coincidía, o subíndices numéricos (A1-Z1) cuando había ciertas diferencias (subtipo: de 2 a 3 diferencias), mismas que se indican en la tabla número 2 (Tenover *at al.*, 1995). Se efectuó el análisis de las imágenes de los geles mediante el programa informático Gel Quant Express, con el que se obtuvo la matriz de datos correspondiente. Los patrones de digestión fueron clasificados mediante un análisis de agrupación utilizando el coeficiente de Dice y el método “Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages” (UPGMA) a través del software NTSYSpc 2.21q, para finalmente generar un dendrograma de agrupación y asignar un pulsotipo (PT).

Tabla 2. Criterios para el análisis de patrones PFGE-*Xba*I (Tenover *et al.*, 1995).

Categoría	No. de diferencias genéticas comparadas con la cepa líder^a	Típico No. de fragmentos diferentes comparados con el patrón de la cepa líder	Interpretación epidemiológica
Indistinguible	0	0	El aislado es parte de un brote
Cercanamente relacionada	1	2-3	El aislado es probablemente parte de un brote
Posiblemente relacionada	2	4-6	El aislado es posiblemente parte de un brote
Diferente	≥3	≥7	El aislado no es parte de un brote

^a: cepa que presenta el patrón de bandeo más común entre los aislados evaluados.

Amplificación mediante PCR de genes BLEE.

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de una sola copia. Con ayuda de esta técnica se amplificaron los genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{OXA-1} en las cepas que presentaron multirresistencia a los antibióticos β-lactámicos (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de genes de resistencia

Oligonucleótidos secuencia 5´- 3´	Condiciones de Amplificación			Referencia (Tamaño)
<i>bla</i>_{CTX-M} (Universal) CTXM-UNI-F: CGATGTGCAGTACCAGTAA CTXM-UNI-R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	94 °C	5 min.	1 ciclo	Batchelor <i>et al.</i> , 2005 (566 pb)
	94°C	30 seg.		
	52 °C	30 seg	35 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 1 CTX-M13U: GGTTAAAAAATCACTGCGYC CTX-M13D: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	94 °C	7 min.	1 ciclo	Briñas <i>et al.</i> , 2005 (843 pb)
	94 °C	50 seg.		
	50 °C	40 seg.	35 ciclos	
	68 °C	1 min.		
	68 °C	5 min.	1 ciclo	
<i>bla</i>_{CTX-M15} CTXM3G-F: GTTACAATGTGTGAGAAGCAG CTXM3G-R: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	94 °C	7 min.	1 ciclo	Pagani <i>et al.</i> , 2003 (1018 pb)
	94 °C	50 seg.		
	50 °C	40 seg.	35 ciclos	
	68 °C	1 min.		
	68 °C	5 min	1 ciclo	
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 9 CTX-M-9-F: GTGACAAAGAGAGTGCAACGG CTX-M-9-R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	94 °C	3 min.	1 ciclo	Coque <i>et al.</i> , 2002 (857 pb)
	94 °C	45 seg.		
	62 °C	45 seg.	35 ciclos	
	72 °C	45 seg.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	
<i>bla</i>_{TEM}	94 °C	3 min.	1 ciclo	Belaaouaj <i>et al.</i> , 1994
	94 °C	1 min.		

TEM-F: ATTCTTGAAGACGAAAGGGC TEM-R: ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	60 °C	1 min.	30 ciclos	(1029 pb)
	72 °C	1 min.		
	72 °C	5 min.	1 ciclo	
bla_{SHV} SHV-F: CACTCAAGGATGTATTGTG SHV-R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96 °C	15 seg.	1 ciclo	Pitout <i>et al.</i> , 1998 (883 pb)
	96 °C	15 seg.		
	52 °C	15 seg.	24 ciclos	
	72 °C	2 min.		
	72 °C	3 min.	1 ciclo	
bla_{OXA-1} OXA-1: CCAAAGACGTGGATG OXA-2: GTTAAATTCGACCCCAAGTT	96 °C	5 min.	1 ciclo	Briñas <i>et al.</i> , 2003 (442 pb)
	96 °C	1 min.		
	61 °C	1 min.	24 ciclos	
	72 °C	2 min.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	
bla_{AmpC} AMPC CAROFF-1: AATGGGTTTTCTACGGTCTG AMPC CAROFF-2: GGGCAGCAAATGTGGAGCAA	94 °C	3 min.	1 ciclo	Carroff <i>et al.</i> , 2000 (192 pb)
	94 °C	1 min.		
	57 °C	30 seg.	30 ciclos	
	72 °C	6 min.		
	72 °C	5 min.	1 ciclo	
bla_{CMY-2} CMY-2-F: GATTCCTTGGACTCTTCAG CMY-2-R: TAAAACCAGGTTCCAGATAGC	95 °C	3 min.	1 ciclo	Stapleton <i>et al.</i> , 1999 (1807 pb)
	95 °C	30 seg.		
	53 °C	30 seg.	30 ciclos	
	72 °C	30 seg.		
	72 °C	3	1 ciclo	

Templado para la amplificación

- ❖ **Extracción por el método de hervido.** Esta técnica se basa en la ruptura celular mediante el proceso físico de la ebullición, permitiendo la salida del contenido celular que queda en suspensión.

Procedimiento

A partir de un cultivo puro en placa de agar TSA de 24 horas, se recogió una asada y se suspendió en 600 μL de agua inyectable en un tubo Eppendorf, posteriormente se mezcló con vórtex y se colocó durante 10 minutos en un baño con agua hirviendo. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a sacar del baño y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se recogió en un tubo Eppendorf limpio y se midió la concentración de DNA y se guardó a -20°C .

Para determinar la concentración y pureza del DNA obtenido se procedió a leer la absorbancia que presenta a 260 y 280 nm con el empleo del NanoDrop (programa NanoDrop 3.0.0). La lectura a 260 nm indica la concentración de DNA teniendo en cuenta que 1 unidad de densidad óptica equivale a 50 ng/mL de DNA de doble hebra. Por otro lado, la pureza del DNA viene determinada por el cociente entre las absorbancias obtenidas a 260 y 280nm. Una preparación pura de DNA daría un cociente entre 1.8 y 2, por lo que si hay contaminación con proteínas o fenol el cociente es menor. Se consideró un rango aceptable entre los valores de 100 a 200 ng/ μL para utilizar ese templado en las PCR. Los volúmenes y concentraciones de los reactivos que conformaron la mezcla de reacción para realizar las PCR se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes y concentraciones de la mezcla de reacción empleadas en las PCRs.

Componente (distribuidor)	Concentración Stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Oligonucleótido "forward" (Sigma)	25 μl	0.3 μl	0.5 μM
Oligonucleótido "reverse" (Sigma)	25 μl	0.3 μl	0.5 μM
BIOTAQTM DNA Polimerasa	5 U/ μl	0.1 μl	1.5 U
Tampón de reacción NH ₄	10 X	1 μl	1 X
MgCl ₂	50 mM	1 μl	1.5 mM
dNTPs mix	2,5 mM	0.4 μl	0.05 mM
DNA	---	0.5 μl	---
Agua Estéril (PISA)	---	6.4 μl	---
Volumen Final de reacción	---	10 μl	---

Condiciones para las PCR

Las condiciones de reacción empleadas fueron las que se muestran en la tabla 3. En cada PCR se utilizaron dos controles: un control negativo que consistió de la misma mezcla de reacción, pero sin DNA, en su lugar se colocó el volumen correspondiente de agua libre de nucleasas; y como control positivo se utilizó el DNA proveniente del lisado bacteriano de las cepas con el gen de interés ya secuenciado.

Visualización de los productos de PCR

Los productos de las PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis con TAE 1X, a 90 Voltios durante 1 hora con 15 minutos junto con un marcador de peso molecular O' Gene Ruler (Fermentans ®, de un rango de 100 a 3000 pb). Posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) 0.5 g/L durante 30 segundos y se lavaron en agua destilada por 1 minuto. Para visualizar los fragmentos de DNA, los geles se fotografiaron en un digitalizador de imágenes ChemiGenius (GenSnapfromSynGene).

Amplificación de genes que codifican para resistencia a quinolonas

Estos genes se amplificaron en aquellas cepas que fueron resistentes a las dos quinolonas evaluadas: ciprofloxacino y ácido nalidíxico. Los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación de estos genes se muestran en la tabla 5. Cabe mencionar que por falta de recursos no se determinaron las mutaciones de los genes cromosómicos *gyrA* y *parC*.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de genes de resistencia a quinolonas.

Oligonucleótidos secuencia 5' - 3'	Condiciones de Amplificación			Referencia (Tamaño)
<i>gyrA</i> GyrA-F: TACACCGGTCAACATTGAGG GyrA-R: TTAATGATTGCCGCCGTCGG	92 °C	3 min.	1 ciclo	Ruiz <i>et al.</i> , 2012 (648 pb)
	92 °C	25 seg.		
	64 °C	1 min.	32 ciclos	
	74 °C	2.5 min.		
	72 °C	3 min.	1 ciclo	
<i>parC</i> ParC-F: AAACCTGTTTCAGCGCCGCATT ParC-R: GTGGTGCCGTTAAGCAA	84 °C	3 min.	1 ciclo	Ruiz <i>et al.</i> , 2012 (395 pb)
	94 °C	1 min.		
	55 °C	1 min.	30 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	3 min.	1 ciclo	
<i>qnrA</i> QnrAm-F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG QnrAm-R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	95 °C	1 min.		Cattoir <i>et al.</i> , 2008 (580 pb)
	55 °C	1 min.	40 ciclos	
	72 °C	1 min.		

	72 °C	7 min.	1 ciclo	
qnrB QnrB-F: GGMATHGAAATTCGCCACTG QnrB-R: TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	95 °C	5 min.	1 ciclo	Cattoir <i>et al.</i> , 2008 (264 pb)
	95 °C	1 min.		
	56 °C	1 min.	35 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	7 min.	1 ciclo	
qnrS QnrSm-F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT QnrSm-R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	95 °C	5 min.	1 ciclo	Cattoir <i>et al.</i> , 2008 (550 pb)
	95 °C	1 min.		
	55 °C	1 min.	35 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	7 min.	1 ciclo	
aac(6')-Ib aac(6')-Ib-F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA aac(6')-Ib-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	94 °C	5 min.	1 ciclo	Park <i>et al.</i> , 2006 (482 pb)
	94 °C	45 seg.		
	60 °C	45 seg.	20 ciclos	
	72 °C	45 seg.		
	72 °C	5 min.	1 ciclo	
qepA QepA-Fnew: GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG QepA-R: CAACTGCTTGAGCCCGTAG	96 °C	1 min.	1 ciclo	Yamane <i>et al.</i> , 2007 (617 pb)
	96 °C	1 min		
	60 °C	1 min	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
oqxA OqxA-F: CTCGGCGCGATGATGCT OqxA-R: CCACTCTTACGGGAGACGA	94 °C	5 min.	1 ciclo	Kim <i>et al.</i> , 2009 (392 pb)
	94 °C	15 seg.		
	45 °C	30 seg.	30 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	7 min.	1 ciclo	
oqxB OqxB-F: TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC OqxB-R: CTCGGCCATTTTGGCGCGTA	94 °C	5 min.	1 ciclo	Kim <i>et al.</i> , 2009 (521pb)
	94 °C	45 seg.		
	64 °C	45 seg.	32 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	7 min.	1 ciclo	

Determinación de filogrupos

Las 30 cepas fueron clasificadas en alguno de los grupos filogenéticos de acuerdo a la metodología descrita por Clermont y colaboradores (Clermont *et al.*, 2013), que se basa en la detección de los genes *chuA*, *yjaA*, *arpa* y el fragmento *TspE4.C2* mediante una PCR cuádruplex y dos simplex (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de los productos esperados de cada gen en las reacciones de PCR para determinar los filogrupos de cepas de *Escherichia coli*

Reacción de PCR	Oligonucleótidos secuencia 5' - 3'	Condiciones de Amplificación			Tamaño (pb)
Cuadruplex	<i>chuA</i> chuA.1b: ATGGTACCGGACGAACCAAC chuA.2: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	94 °C	4 min.	1 ciclo	288
	<i>yjaA</i> yjaA.1b: CAAACGTGAAGTGTCAGGAG yjaA.2b: AATGCGTTCCTCAACCTGTG	94 °C	5 seg.		211
	<i>TspE4.C2</i> TspE4C2.1b: CACTATTCGTAAGGTCATCC TspE4C2.2b: AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	59 °C	20 seg.	30 ciclos	152
	<i>Arpa</i> AceK.f: AACGCTATTCGCCAGCTTGC ArpA1.r: TCTCCCCATACCGTACGCTA	72 °C	30 seg.		
Grupo E	<i>Arpa</i> ArpAgpE.f: GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC ArpAgpE.r: GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	72 °C	5 min.	1 ciclo	301
		94 °C	4 min.	1 ciclo	
		94 °C	5 seg.		
		57 °C	20 min.	30 ciclos	
		72 °C	30 seg.		
<i>trpA</i>	72 °C	5 min.	1 ciclo		
	94 °C	4 min.	1 ciclo		
		94 °C	5 seg.		

Grupo C	trpAgpC.1: AGTTTTATGCCAGTGCGAG	59 °C	20 min.	30 ciclos	219
	trpAgpC.2: TCTGCGCCGGTCACGCC	72 °C	30 seg.		
		72 °C	5 min.	1 ciclo	
Control Interno	trpA trpBA.f: CGGCGATAAAGACATCTTCAC trpBA.r: GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	Usados en PCR grupo C y E			489

Fuente: Clermont *et al.*, 2013.

El método se inició con la obtención de los amplificados descritos en la PCR cuádruplex (Figura 8), en caso de que con esta reacción no se definiera el Filogrupo, se procedió a realizar las PCR específicas para los grupos E o C (Tabla 6).

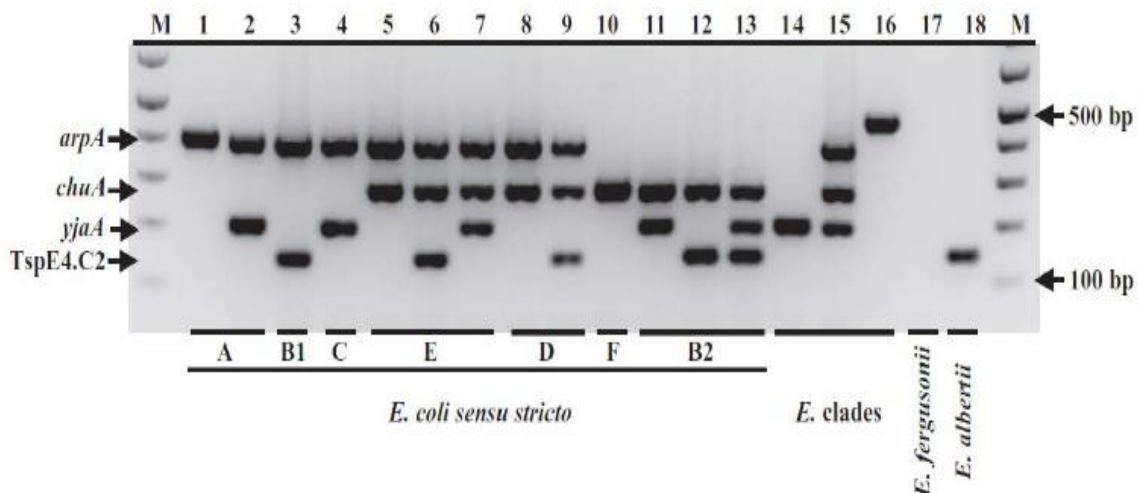


Figura 8. Amplificados esperados en la PCR cuádruplex y filogrupo asignado. Carril 1, grupo A (REL606, + - - -); 2, grupo A (K-12 MG1655, + - + -); 3, grupo B1 (IAI1, + - - +); 4, grupo C (ECOR70, + - + -); 5, grupo E (EDL933, + + - -); 6, grupo E (ECOR31, + + - +); 7, grupo E (E101, + + + -); 8, grupo D (UMN026, + + - -); 9, grupo D (Py199, + + - +); 10, grupo F (IAI39, - + - -); 11, grupo B2 (ECOR60, - + + -); 12, grupo B2 (IAI53, - + - +); 13, grupo B2 (ED1a, - + + +); grupo 14, *Escherichia* clado I (M863, - - + -); 15, *Escherichia* clado I (IAI32, + + + -); 16, *Escherichia* clado V [E1118, (476)- - - -], la banda adicional de (476 pb) corresponde a la amplificación de *chuA* con los oligonucleótidos *chuA2* y *AceK.f*; 17, *Escherichia fergusonii* (ATCC35469, - - - -); 18, *Escherichia albertii* (TW07627, - - - +). M, marcador de peso molecular. Tomada de Clermont *et al.*, 2013

Finalmente, a cada *E. coli* se asignó un grupo filogenético con base a la combinación de amplificados que se detalla en la tabla 7. Para esta metodología no se contó con controles

positivos, por lo que el tamaño de cada amplificado se determinó comparando con un marcador de peso molecular (O' GeneRuler®, rango de 100 a 3000 pb).

Tabla 7. Criterios de asignación filogenética.

Genotipo (PCR cuádruplex)				Filogrupo	Procedimiento
arpA (400 pb)	chuA (288 pb)	yjaA (211 pb)	TspE4.C2 (152 pb)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Debe ser confirmado con la búsqueda del gen <i>ibaA</i> ^a
+	-	+	-	A o C	Usar primers específicos para C, si es C+ es C, sino A
+	+	-	-	D o E	Usar primers específicos para E, si es E+ es E, sino D
+	+	-	+	D o E	Usar primers específicos para E, si es E+ es E, sino D
+	+	+	-	E o clado I	Usar primers específicos para E, si es E-, es clado I, confirmar usando primers de clado críptico ^b
-	-	+	-	Clado I o II	Confirmar usando primers de clado críptico ^b
-	(476) ^c	-	-	Clado III, IV o V	Confirmar usando primers de clado críptico ^b
-	-	-	+	Desconocido	Realizar MLST
-	-	+	+	Desconocido	Realizar MLST
+	-	+	+	Desconocido	Realizar MLST
+	+	+	+	Desconocido	Realizar MLST
-	-	-	-	Desconocido	Confirmar identificación de <i>E. coli</i> con primers <i>uidA</i> , si es positivo confirmar usando primers de clado críptico ^b y/o MLST

a: Gordon y colaboradores (2008).

b: Clermont y colaboradores (2011b).

c: La PCR cuádruplex resulta con un producto de 476 pb en aquellas cepas que pertenezcan a los clados crípticos III, IV o V. Si esto ocurre, se deberá hacer la detección del clado críptico usando los primers correspondientes (Clermont *et al.*, 2011b).

Determinación del Patotipo Extraintestinal

A las 30 cepas se les realizó la búsqueda del patotipo extraintestinal. Debido al origen de la muestra del que procedían se utilizaron distintos pares de oligonucleótidos los cuales correspondían a fragmentos de las islas de patogenicidad de tres cepas características de *Escherichia coli* Uropatógena (CFT073, J96 y 536) utilizados por Sabaté y colaboradores (Sabaté *et al.*, 2006). Las condiciones de reacción así como los oligonucleótidos empleados fueron las que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en la búsqueda de patotipos.

Oligonucleótidos secuencia 5' - 3'	Condiciones de Amplificación			Referencia (Tamaño)
PAI I_{CFT073} RPAi -F: GGA CAT CCT GTT ACA GCG CGC A RPAf -R: TCG CCA CCA ATC ACA GC GAA C	94 °C	5 min.	1 ciclo	Jhonson y Stell <i>et al.</i> , 2000 (930 pb)
	94 °C	1 min.		
	65 °C	1 min.	30 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	
PAI II_{CFT073} cft073.2Ent1-F: ATG GAT GTT GTA TCG CGC cft073.2Ent2-R: ACG AGC ATG TGG ATC TGC	94 °C	5 min.	1 ciclo	Sabaté <i>et al.</i> , 2006 (308 pb)
	94 °C	1 min.		
	55 °C	1 min.	30 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	
PAI I_{J96} PapGlf-F: TCG TGC TCA GGT CCG GAA TTT PapGlr-R: TGG CAT CCC ACA TTA TCG	94 °C	5 min.	1 ciclo	Jhonson y Stell <i>et al.</i> , 2000 (2300 pb)
	94 °C	1 min.		
	57.7 °C	1 min.	30 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	
PAI II_{J96} Hlyd-F: GGA TCC ATG AAA ACA TGG TTA ATG GG Cnf-R: GAT ATT TTT GTT GCC ATT GGT TAC C	94 °C	5 min.	1 ciclo	Landraud <i>et al.</i> , 2003 (400 pb)
	94 °C	1 min.		
	59.3 °C	1 min.	35 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	
	95 °C	5 min.	1 ciclo	

PAI I₅₃₆ I.9 –F: TAA TGC CGG AGA TTC ATT GTC I.10-R: AGG ATT TGT CTC AGG GCT TT	95 °C	1 min.		Sabaté <i>et al.</i> , 2006 (1800 pb)
	56 °C	1 min.	35 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	
PAI II₅₃₆ orf1up-F: CAT GTC CAA AGC TCG AGC C orf1down-R: CTA CGT CAG GCT GGC TTT G	94 °C	5 min.	1 ciclo	Sabaté <i>et al.</i> , 2006 (1000 pb)
	94 °C	1 min.		
	56 °C	1 min.	20 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	
PAI III₅₃₆ sfaAI.1-F : CGG GCA TGC ATC AAT TAT CTT TG sfaAI.2-R: TGT GTA GAT GCA GTC ACT CCG	96 °C	5 min.	1 ciclo	Sabaté <i>et al.</i> , 2006 (200 pb)
	96 °C	1 min.		
	55 °C	1 min.	30 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	
PAI IV₅₃₆ IRP2-FP: AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC IRP2-RP: TCG TCG GGC AGC GTT TCT TCT	94 °C	5 min.	1 ciclo	Sabaté <i>et al.</i> , 2006 (300 pb)
	94 °C	1 min.		
	55 °C	1 min.	30 ciclos	
	72 °C	1 min.		
	72 °C	10 min.	1 ciclo	

Serotificación

Las 26 cepas fueron tipificadas mediante la determinación de los antígenos O (somático) y H (flagelar), usando sueros de referencia (Statens Serum Institute). Esta parte metodológica se realizó en el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, con la colaboración con el Dr. Armando Navarro. Las cepas fueron serotipificadas mediante ensayos de aglutinación (Ørskov and Ørskov, 1984) usando placas de microtitulación con 96 pozos y suero de conejo (SERUNAM), obtenido de 187 antígenos somáticos y 53 flagelares específicos para *E. coli*.

Caracterización parcial de Plásmidos

Para poner en evidencia la posible transferencia horizontal de genes de resistencia a través de plásmidos, en las cepas estudiadas, se procedió a determinar el tipo de replicón en las 30 cepas.

Tipado de plásmidos por “PCR-based replicon typing” (PBRT)

Este método descrito por Carattoli y colaboradores, se basa en el tipado de plásmidos mediante la amplificación por PCR de replicones pertenecientes a los grupos de incompatibilidad (Inc) reportados por Carattoli y colaboradores para enterobacterias (Carattoli *et al.*, 2005a). Esta técnica contempla la realización de 5 PCR múltiplex y 3 PCR simplex con los oligonucleótidos y condiciones que se describen en la tabla 9. También se realizó la búsqueda de otros replicones no considerados en la metodología anterior, que fueron identificados posteriormente, como IncT, IncU y el plásmido ori colE; cuyos oligonucleótidos también se muestran en la tabla 9 (García-Fernández *et al.*, 2009).

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados en la búsqueda de replicones plasmídicos.

Replicón	Oligonucleótidos (5' - 3')	Sitio Blanco	Tamaño (pb)
IncHI1	F: GGAGCGATGGACTTACTTCAGTAC R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	parA-parB	471
IncHI2	F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	Iterones	644
IncI1	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	RNAI	139
IncX	F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	ori γ	376
IncL/M	F: GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	repA,B,C	785
IncN	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	repA	559
IncFIA	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	Iterones	462
IncFIB	F: TCTGTTTATTCTTTACTGTCCAC R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	repA	702
IncW	F: CCTAAGAACAACAAGCCCCCG R: GGTGCGCGGCATAGAACCCT	repA	242
IncY	F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	repA	765
IncP	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	iterones	534
IncFIC	F: GTGAACCTGGCAGATGAGGAAGG R: TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT	repA2	262
IncA/C	F: GAGAACCAAGACAAAGACCTGGA R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	repA	465
IncT	F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	repA	750

IncF _{repB}	F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG R: GAAGATCAGTCACACCATCC	RNAI/repA	270
IncFII _s	F: CTAAGAATTTTGATGGCTGGC R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC	repA	270
IncK	F: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC R: TCTTTCACGAGCCC GCCAAA	RNAI	160
IncB/O	F: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC R: TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA	RNAI	159
IncR	F: TCGCTTCATTCTGCTTCAGC R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	Plásmido R	251
IncU	F: TCACGACACAAGCGCAAGGG R: TCATGGTACATCTGGGCGC	Plásmido U	843
OricoIE	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGCGAAACCCGACAGGACT	Plásmido coIE	187
OricoIE _{TP}	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGTTTACCGGTGTCATTCC	Plásmido CoIETp	106

RESULTADOS

Objetivo 1. Susceptibilidad de cepas de *E. coli* aisladas de muestras clínicas.

Material biológico

Se recibieron un total de 36 cepas (Tabla 10), aisladas de pacientes con diferentes patologías, tanto hospitalizados como ambulatorios, todos provenientes del Hospital de especialidades ISSSTE de Puebla gracias a la colaboración con la Q.F.B. Guadalupe Jiménez Flores, durante el periodo de septiembre de 2015 a abril de 2016.

Las 36 cepas recibidas traían consigo un reporte de identificación previo mediante equipo semiautomatizado VITEK®; sin embargo, en nuestro laboratorio se corroboró la identificación mediante pruebas bioquímicas (mencionadas en material y métodos), de acuerdo al procedimiento del anexo 1. En algunos casos la cepa reportada por el Hospital ISSSTE fue diferente de la bacteria que reportamos en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad.

Tabla 10. Cepas aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla, durante el periodo de septiembre de 2015 a abril de 2016.

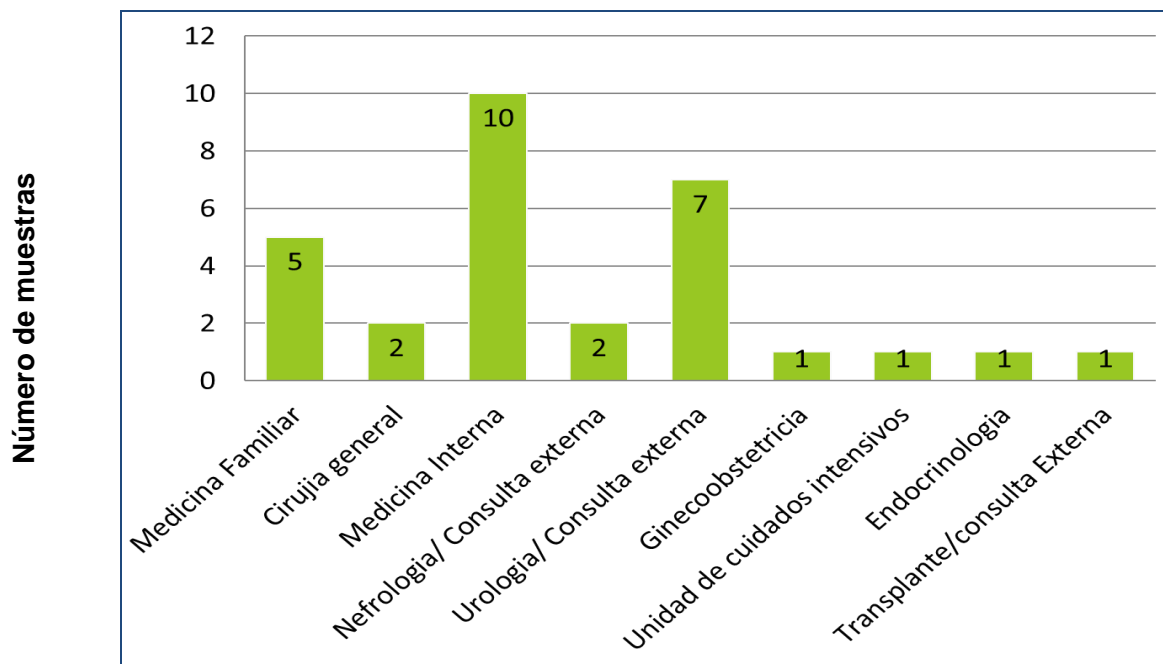
Número	Cepa Reportada	Origen de la muestra	Servicio	Edad (años)	Sexo
I-0001	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	Urocultivo	Medicina Interna	42	M
I-0002	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina Interna	37	M
I-0003	<i>Escherichia coli</i>	Cultivo de Herida	Medicina Interna	35	F
I-0004	<i>Escherichia coli</i>	Cultivo de Expectoración	Medicina Interna	52	F
I-0005	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	Urocultivo	Medicina familiar	93	M
I-0006	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Endocrinología	75	F
I-0007	<i>Salmonela spp</i>	Coprocultivo	Nefrología/ consulta Externa	51	F
I-0008	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Urología/Consulta Externa	53	F
I-0009	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	Cultivo Vaginal	Medicina Interna	77	F
I-0010	<i>Proteus mirabilis</i>	Urocultivo	Urología/Consulta Externa	51	M

I-0011	<i>Klebsiela pneumoniae</i>	Urocultivo	Unidad de cuidados intensivos	0	M
I-0012	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina Interna	65	F
I-0013	<i>Escherichia coli</i>	Lavado Bronquial	Medicina Interna	36	M
I-0014	<i>Escherichia coli</i>	Herida Quirúrgica	Cirugía General	58	F
I-0015	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina Interna	73	F
I-0016	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina familiar	88	M
I-0017	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina Interna	63	F
I-0018	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina familiar	49	F
I-0019	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina Interna	65	F
I-0020	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Nefrología/ consulta Externa	55	M
I-0021	<i>Escherichia coli</i>	Cultivo Vaginal	Urología/Consulta Externa	77	F
I-0022	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina Interna	55	M
I-0023	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Ginecoobstetricia	30	F
I-0024	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina Familiar	55	F
I-0025	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Urología/Consulta Externa	83	M
I-0026	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina Interna	79	F
I-0027	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Urología/Consulta Externa	76	F
I-0028	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Nefrología/ consulta Externa	81	M
I-0029	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Urología/Consulta Externa	53	M
I-0030	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Urología/Consulta Externa	54	F
I-0031	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Nefrología/ consulta Externa	80	F
I-0032	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Trasplante/consulta Externa	42	F
I-0033	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Urología/Consulta Externa	72	M
I-0034	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Medicina familiar	65	F
I-0035	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Cirugía General	65	F
I-0036	<i>Escherichia coli</i>	Urocultivo	Urología/Consulta Externa	86	M

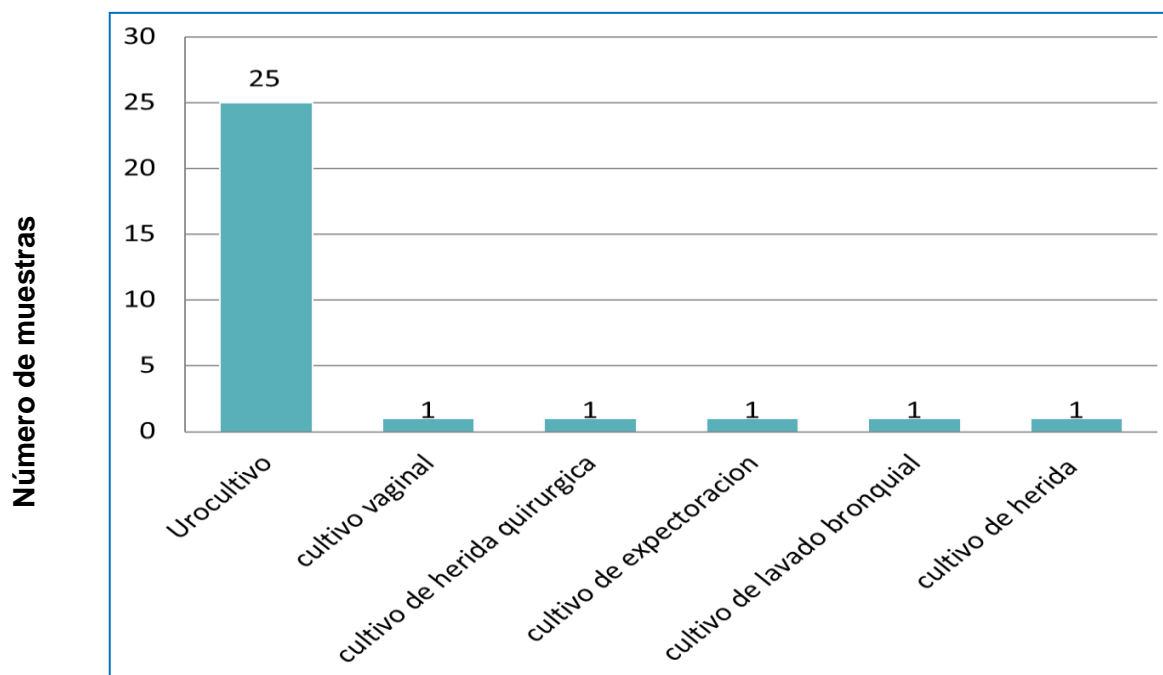
F: Femenino

M: Masculino

De las 36 cepas recibidas, solo 30 cepas fueron identificadas como *Escherichia coli*, las cuales pasaron a la siguiente etapa del estudio. El servicio y origen de aislamiento fue variado siendo el servicio de medicina interna con mayor número de muestras (10/33.3%), y urocultivo el mayor origen de aislamiento de las muestras (25/83.3%) Gráfica 1, Gráfica 2



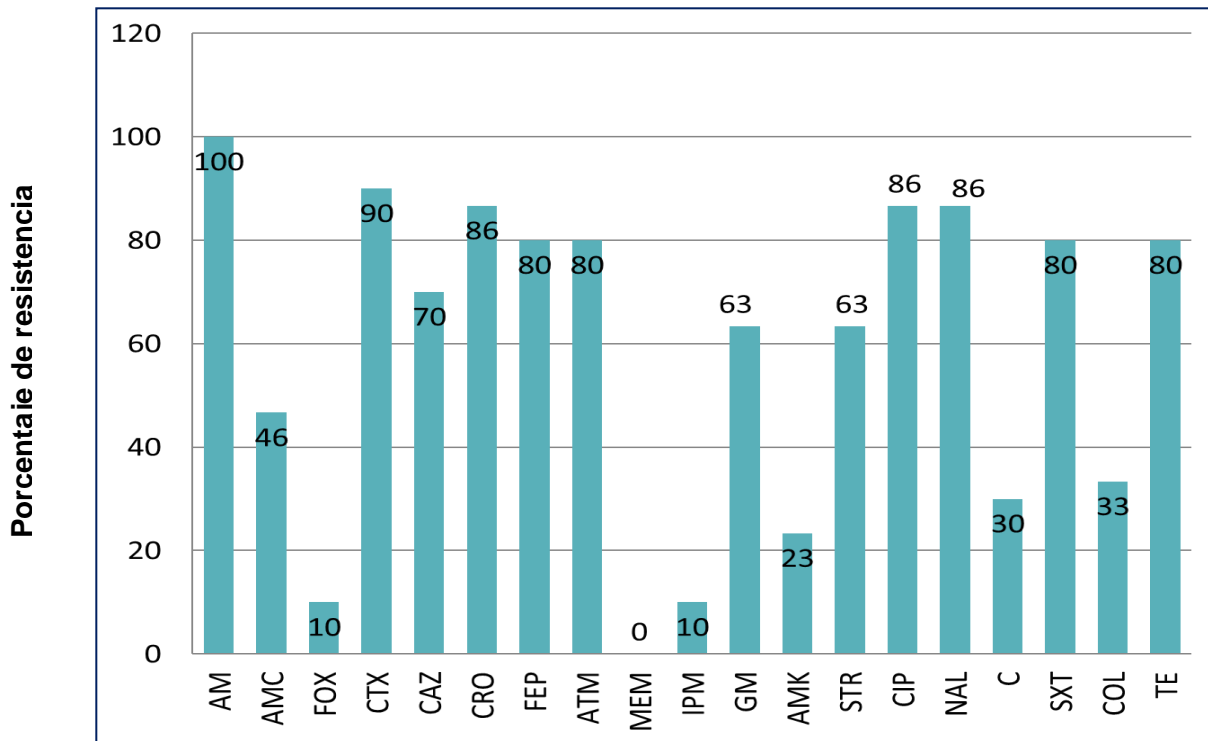
Gráfica 1. Servicio de procedencia de las 30 cepas de *Escherichia coli* del hospital regional ISSSTE de Puebla



Gráfica 2. Origen de aislamiento de las 30 cepas de *Escherichia coli* del hospital regional ISSSTE de Puebla.

Perfil de susceptibilidad

A las 30 cepas se les determinó el perfil de susceptibilidad por el método de Kirby-Baüer, de las 30 cepas identificadas como *Escherichia coli*, el 86.6% (26/30) presentó multirresistencia (resistencia a 2 o más miembros de dos o más familias distintas de antibióticos) (Gráfica 3). El número de cepas resistentes a los β -lactámicos fue elevado siendo mayor del 80% para 6 antibióticos: AMP, CTX, CAZ, CRO, FEP y ATM (100, 90, 70, 86, 80 y 80%, respectivamente); para AMC y FOX fue menor con un 36% y 10% respectivamente; mientras que para los carbapenémicos un 10% de las cepas presentó resistencia a IMP y para MEM todas las cepas fueron sensibles. De igual manera para las dos quinolonas ensayadas (NA y CIP) la resistencia fue alta con un 86% de las cepas para ambos antibióticos. Lo mismo sucedió con los aminoglucósidos, ya que hubo resistencia del 63% de las cepas, tanto para GM y S. Para antibióticos de otras familias la resistencia fue mayor para TE y SXT con 80% de las cepas en ambos casos (Tabla 11) (Gráfica 3).

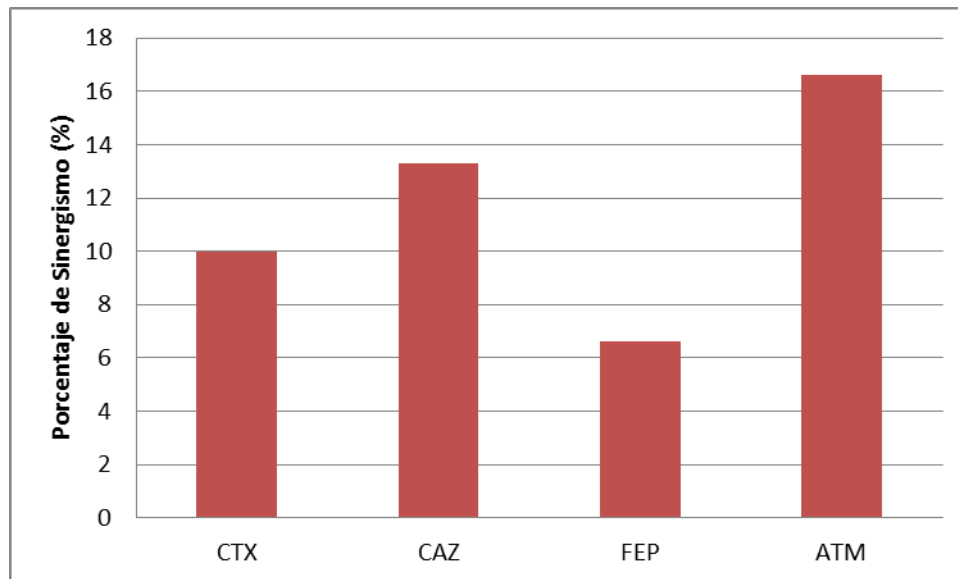


Gráfica 3. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos ensayados de las diferentes familias en las 30 cepas de *E. coli* aisladas en pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla. AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico; FOX: Cefoxitina; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; MEM: Meropenem; IMP: Imipenem; GM: Gentamicina; AMK: Amikacina; STR: Streptomina; NA: Ácido nalidíxico; CIP: Ciprofloxacina; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprim; COL: Colistina; TE: Tetraciclina.

Ciprofloxacino; C: Cloranfenicol; SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol; COL: Colistina; TE: Tetraciclina; Criterios de interpretación tomados de CLSI, 2017.

Objetivo 2: Fenotipo de la producción de BLEE.

Posterior al perfil de susceptibilidad, se determinó en las 30 cepas la producción fenotípica de BLEE, de las 30 cepas, solo 6 (20%) (Tabla 11), presentaron el fenotipo de BLEE, siendo positivas al sinergismo con los 4 antibióticos de la prueba (Gráfica 4).



Gráfica 4. Porcentaje de efecto positivo (sinergismo) de las 30 cepas de *E. coli* del Hospital Regional ISSSTE de Puebla, a los antibióticos ensayados en la prueba de difusión con doble disco en la producción de BLEE.

Tabla 11. Fenotipo de Resistencia y producción fenotípica de BLEE																				
Cepa	AM	AMC	FOX	CTX	CAZ	CRO	FEP	ATM	MEM	IPM	GM	AMK	STR	CIP	NAL	C	SXT	COL	TE	Fenotipo BLEE
I-0002	R	I	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	-
I-0003	R	I	I	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	R	-
I-0004	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I	S	R	R	S	R	S	R	-
I-0006	R	R	R	R	I	I	S	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	CTX,CAZ
I-0011	R	R	R	R	I	R	R	I	S	I	R	R	R	R	I	S	R	R	R	CTX,ATM,CAZ
I-0012	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	-
I-0013	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	-
I-0014	R	I	S	R	I	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	-
I-0019	R	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	I	R	R	S	-
I-0022	R	S	S	R	I	R	R	R	S	S	I	S	R	R	R	S	R	S	S	-
I-0026	R	R	I	R	R	R	R	R	S	I	R	S	R	R	R	S	R	S	R	-
I-0005	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	-
I-0016	R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	I	R	R	S	R	S	R	FEP,CAZ
I-0018	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	-
I-0021	R	R	S	R	I	R	R	R	S	I	S	S	I	I	R	S	R	S	S	-
I-0023	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	R	R	S	R	R	S	-
I-0024	R	R	S	R	R	R	S	R	S	I	I	S	R	I	R	R	R	R	R	-
I-0025	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	I	-
I-0027	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	CTX,FEP,CAZ
I-0028	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	R	R	S	R	S	R	-
I-0029	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	-
I-0030	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	I	I	R	R	S	R	S	R	FEP,CAZ
I-0032	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	-
I-0033	R	I	I	R	R	R	R	R	S	I	R	S	R	R	R	R	R	S	R	FEP,ATM

I-0034	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	I	R	R	S	S	S	S	-
I-0036	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	I	R	R	S	S	S	R	-

AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico; FOX: Cefoxitina; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepime; ATM: Aztreonam; IMP: Imipenem; MEM: Meropenem; AK: Amikacina; GM: Gentamicina; S: Estreptomicina; NA: Ácido nalidíxico; CIP: Ciprofloxacino; C: Cloranfenicol; TE: Tetraciclina; COL: Colistina; SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol.
R: Resistente; S: Sensible. (CLSI, 2017).

Objetivo 3: Relación clonal de cepas clínicas de *E. coli* por medio de electroforesis en geles de campos pulsados (PFGE).

Los 30 aislados fueron sometidos a la macrorestricción del DNA genómico por medio de la enzima *Xba*I de estos aislados, lo cual generó de 14 a 28 bandas claramente visibles. El análisis de la macrorestricción y de los fragmentos generados resultó en 30 diferentes patrones de bandeo. En la Figura 9 se muestra un ejemplo del bandeo presentado.

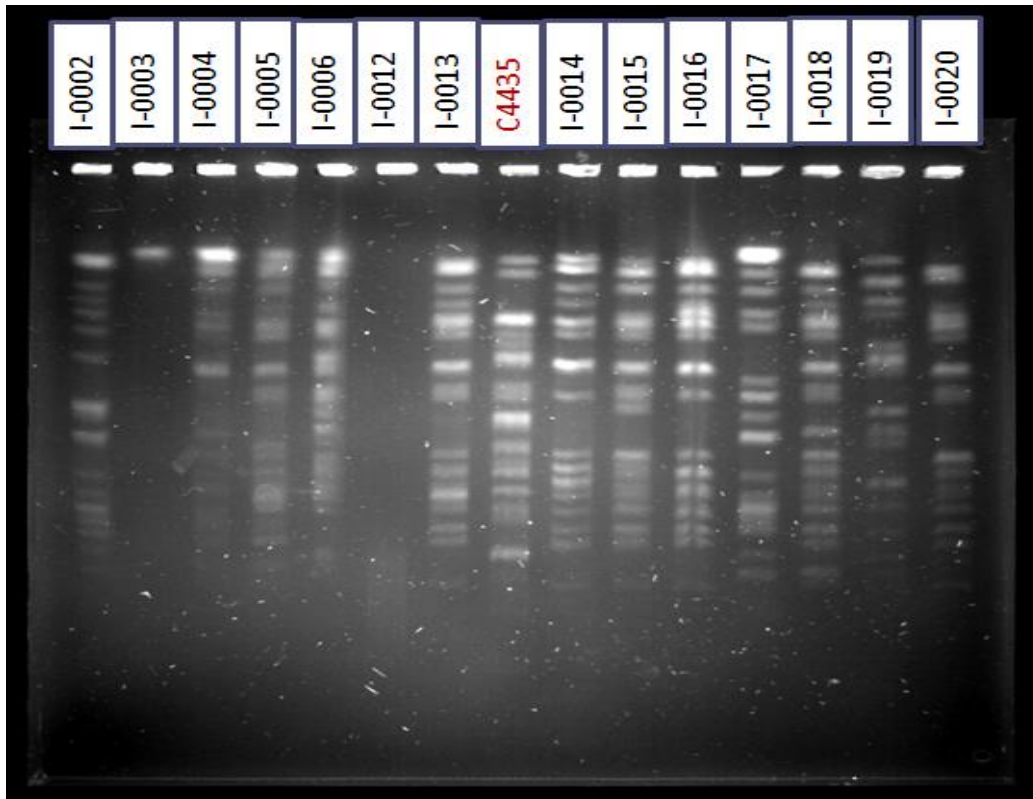


Figura 9. Perfil de PFGE de aislados clínicos de *Escherichia coli* del Hospital Regional ISSSTE de la ciudad de Puebla. Se muestra un ejemplo de los patrones de bandeo de DNA genómico digerido con la enzima de restricción *Xba*I de algunos aislados clínicos de *E. coli*. La cepa C4435 fue utilizada como cepa de referencia.

A partir de las imágenes de los corrimientos electroforéticos se elaboraron matrices de similitud y posteriormente se elaboró un dendrograma (Figura 10) con el programa NTSYSpc 2.21q (Dice/UPGMA).

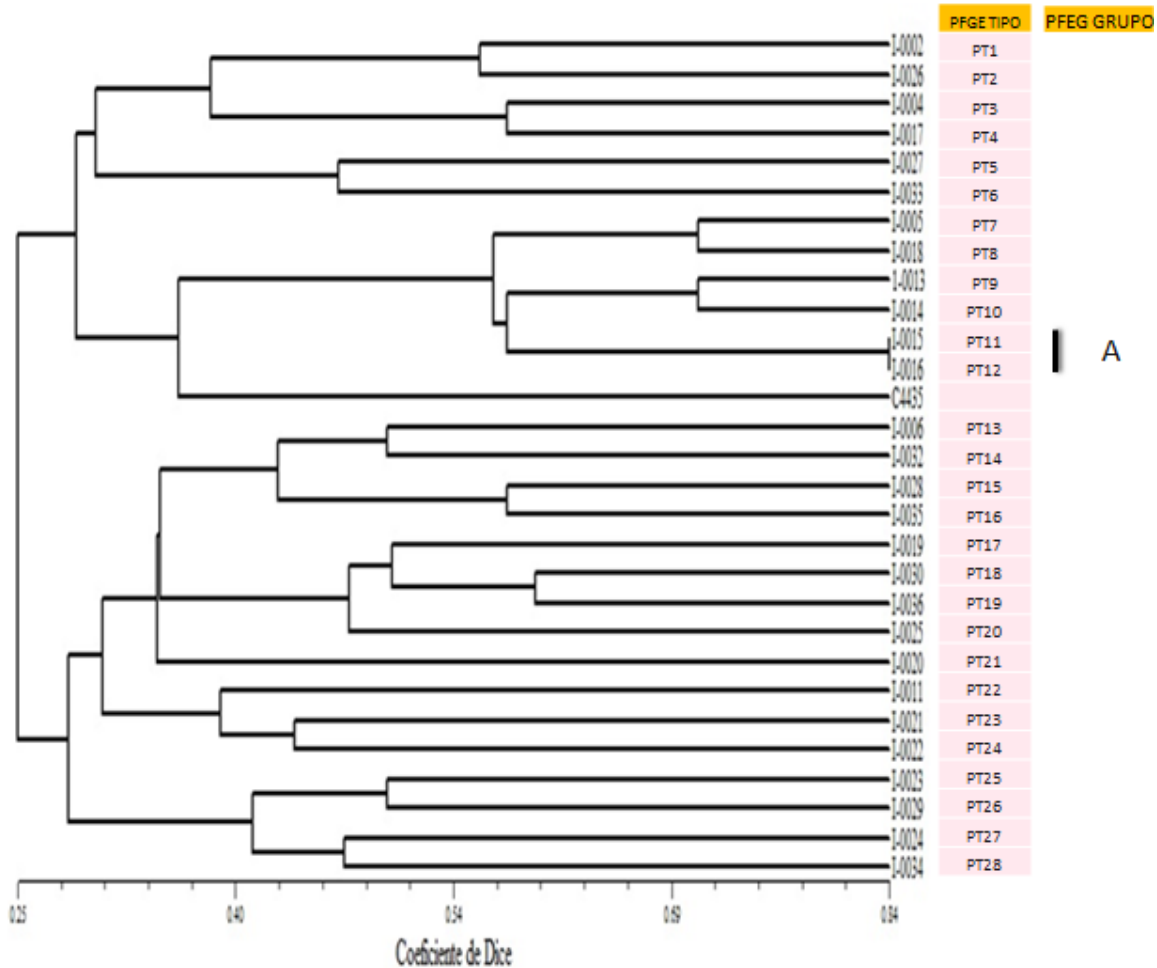


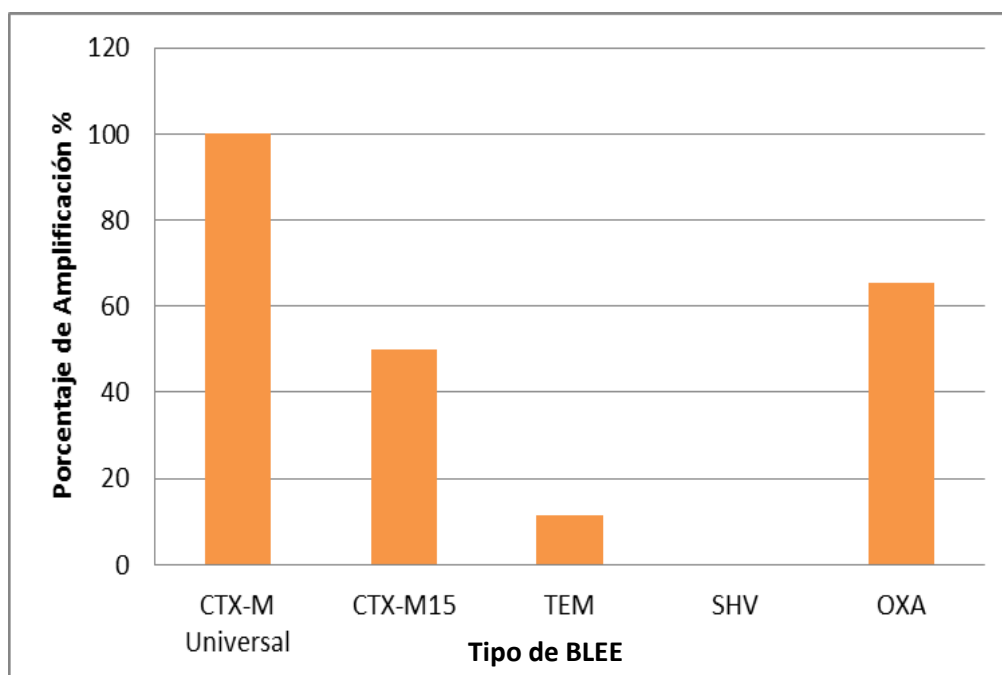
Figura 10: Dendrograma UPGMA elaborado mediante el programa NTSYS pc 2.21q software. PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión genómica-*XbaI* de 28 aislados clínicos provenientes del hospital ISSSTE de Puebla. Clasificación basada en el análisis de agrupación utilizando el coeficiente de similitud de Dice (valor > 80%).

Con la finalidad de establecer posibles relaciones genéticas entre los aislados clínicos de *E. coli* de esta Unidad Hospitalaria, se utilizó el coeficiente de similitud de Dice. Las cepas que presentaron un coeficiente de similitud de 1 en los patrones de bandeos, se incluyeron en el mismo pulsotipo (PT) y se enumeraron de manera secuencial. Además, los aislados que presentaron un coeficiente de similitud ≥ 0.80 fueron incluidos en el mismo grupo, y fueron designados por letras del abecedario.

Bajo estos criterios tomados se identificaron 28 pulstipos (PT's) los cuales se nombraron como PT1 a PT28, así como 1 grupo con dos aislados, asignados con la letra A. Los dos aislados de este grupo están relacionados genéticamente, según los criterios de Tenover *et al.* 1995 (≤ 6 diferencias en los fragmentos de restricción). Los aislados restantes que se encuentran en el dendograma, con coeficientes de Dice menores a 0.65 fueron definidos como no relacionados genéticamente según los mismos criterios.

Objetivo 4: Genes que codifican la producción de BLEE tipo CTX-M grupo I y 9, TEM, SHV, AmpC y OXA-1 en los aislamientos mediante PCR y secuenciación.

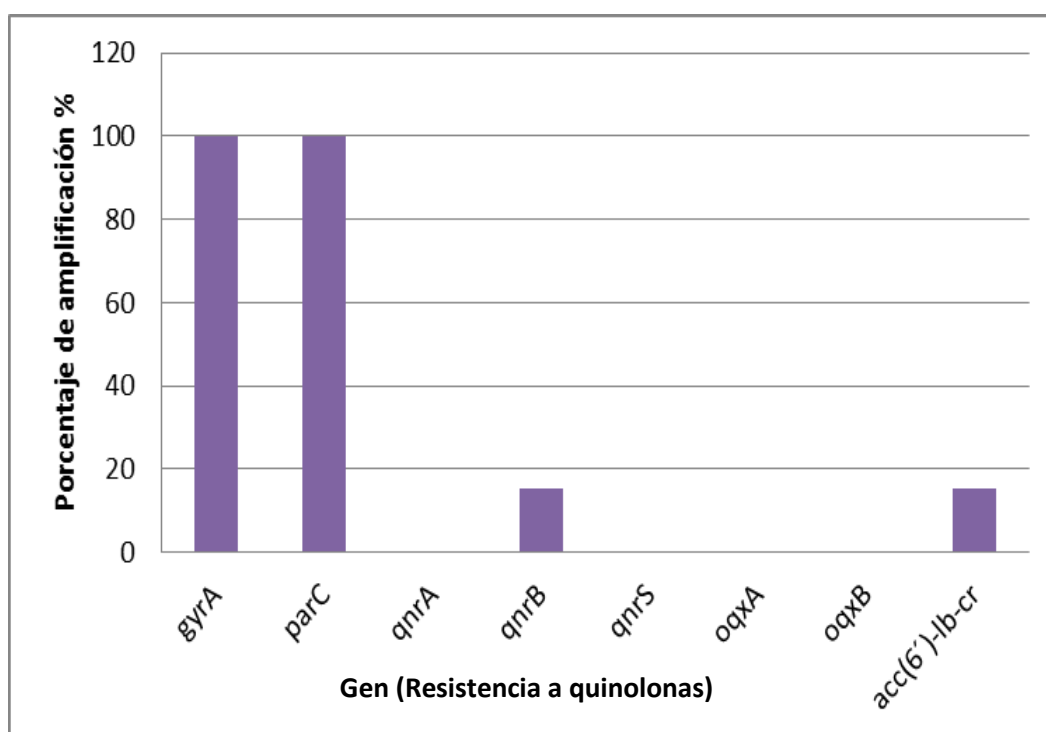
De las 30 cepas de *E. coli*, se seleccionaron 26 (86.6%), las cuales tuvieron un fenotipo de multirresistencia, principalmente a la mayoría de los β -Lactámicos y a las dos quinolonas ensayadas por Kirby-Baüer. De las 26 cepas seleccionadas, las 26 amplificaron el fragmento del gen CTX-M universal. Para profundizar un poco más en este resultado, se buscó si estos genes encontrados pertenecían a la variante de CTX-M15, la cual está ampliamente distribuida en *E. coli* a nivel mundial en diferentes nichos ecológicos. Por lo tanto, se utilizaron oligonucleótidos específicos para esta variante, de las cuales amplificaron en 13 cepas. Para los demás genes de las principales β -Lactamasas, 3 cepas amplificaron el gen *bla*_{TEM} (11.5%); 17 cepas el gen *bla*_{OXA} (65.3%) y ninguna cepa dio positivo para la amplificación del gen *bla*_{SHV} (Gráfica 5).



Gráfica 5. Amplificación mediante PCR de los genes codificantes para BLEE en 26 cepas de *E. coli* multidrogresistentes, aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.

Objetivo 5: Genes que codifican para resistencia plasmídica y cromosómica a quinolonas.

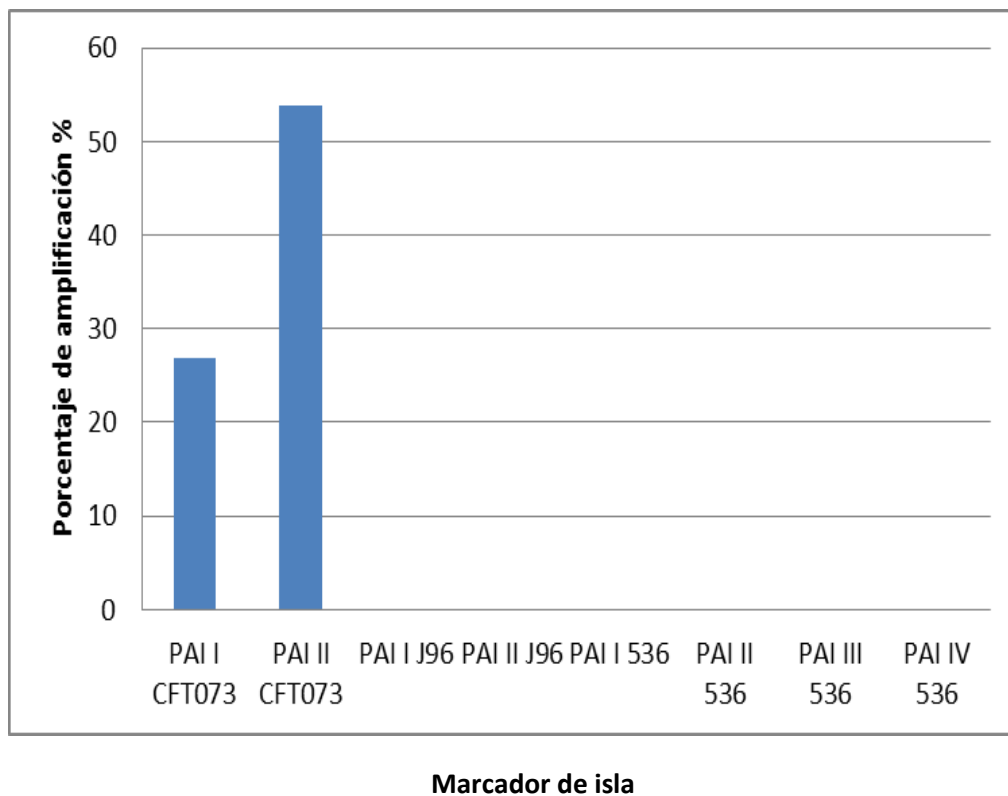
Se realizó la búsqueda de genes plasmídicos responsables de la resistencia a quinolonas. La amplificación de estos genes se realizó en las mismas 26 cepas que los genes de BLEE. De las 26 cepas, todas amplificaron para los genes *parC* y *gyrA*. Por otro lado, ninguna cepa amplificó para los genes *qnrA* y *qnrS*; 4 cepas (15.3%) amplificaron el gen *qnrB*, 4 cepas (15.3%) el gen *acc(6')-Ib* y ninguna cepa amplificó los genes *qepA*, *oqxA* y *oqxB* (Gráfica 6).



Gráfica 6. Amplificación mediante PCR de los genes codificantes para resistencia a quinolonas en las 26 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.

Objetivo 6: Patotipo y serotipo de las cepas clínicas de *Escherichia coli* resistentes a β -lactámicos y quinolonas.

A las 26 cepas clínicas de *E. coli* se les determinó el patotipo extraintestinal; de estas, 7 cepas amplificaron el fragmento de la PAI I_{CFT073} (26.92%), mientras que 14 cepas amplificaron el fragmento de la PAI II_{CFT073} (53.8%). Por otro lado, cinco cepas I-0005, I-0013, I-0016, I-0024 e I-0028 amplificaron para las dos islas de patogenicidad de la cepa PAI-CFT073 (Gráfica 7) que corresponde una cepa de UPEC aislada de la sangre y orina de una paciente con pielonefritis (Schmidt *et al.*, 2004).



Gráfica 7. Amplificación mediante PCR de los fragmentos de las islas de patogenicidad de 3 cepas características de UPEC (CFT073, J96 y 536) de las 26 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.

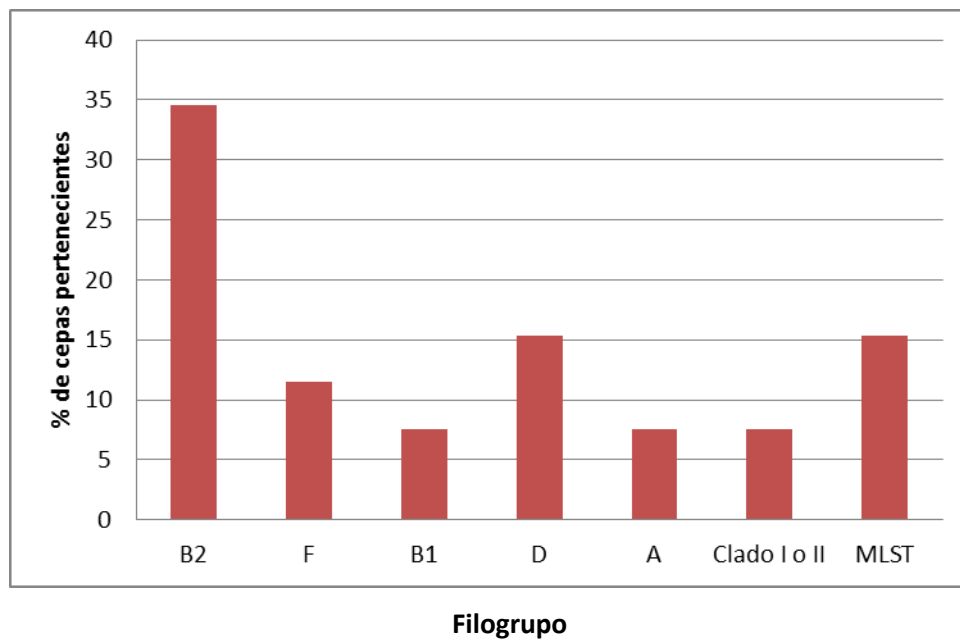
Con respecto al serotipo de las 26 cepas estudiadas, este ensayo se realizó mediante ensayos de aglutinación, en el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, a través de la colaboración con el Dr. Armando Navarro. Se obtuvo que aunque las cepas mostraron varios serotipos, 9 cepas de *E. coli* (34.61%) fueron serotipo O25H4 (Tabla 12).

Tabla 12: Serotipo de las 26 cepas estudiadas de *Escherichia coli*.

Cepa	Origen	Serotipo	
		O	H
I-0002	Urocultivo	O102	H6
I-0003	Cultivo de Herida	O28	H5
I-0004	Cultivo de Expectoración	OR	H4
I-0005	Urocultivo	O25	H4
I-0006	Urocultivo	O1	H6
I-0011	Urocultivo	O-	H-
I-0012	Urocultivo	O25	H4
I-0013	Lavado Bronquial	O25	H4
I-0014	Cultivo de herida Quirúrgica	O25	H4
I-0016	Urocultivo	O25	H4
I-0018	Urocultivo	O25	H4
I-0019	Urocultivo	O100	H12
I-0021	Cultivo Vaginal	OR	H4
I-0022	Urocultivo	O25	H4
I-0023	Urocultivo	O9	H19
I-0024	Urocultivo	OR	H19
I-0025	Urocultivo	O100	H-
I-0026	Urocultivo	OR	H4
I-0027	Urocultivo	O-	H-
I-0028	Urocultivo	O25	H4
I-0029	Urocultivo	OR	H4
I-0030	Urocultivo	O101	H-
I-0032	Urocultivo	OR	H5
I-0033	Urocultivo	OR	H-
I-0034	Urocultivo	O25	H4
I-0036	Urocultivo	OR	H4

Objetivo 7: Filogenia de las cepas clínicas de *Escherichia coli* resistentes a β -lactámicos y quinolonas.

A las 26 cepas de *E. coli*, Se les determinó el grupo filogenético como se describió anteriormente, obteniendo que 9 cepas (34.6%) correspondieron al grupo filogenético B2, 4 cepas (15.38%) al filogrupo D, 3 cepas (11.5%) al filogrupo F, 2 cepas (7.69%) al filogrupo B1, 2 cepas (7.69%) al filogrupo A, 2 cepas (7.69%) pertenecen a los clados I o II de *E. coli* y 4 cepas (15.38%) no fueron clasificadas dentro de alguno de estos grupos por lo que es necesario realizarles MLST para poder conocer su origen, de acuerdo a los criterios de Clermont (Clermont *et al.*, 2013) (Gráfica 8).

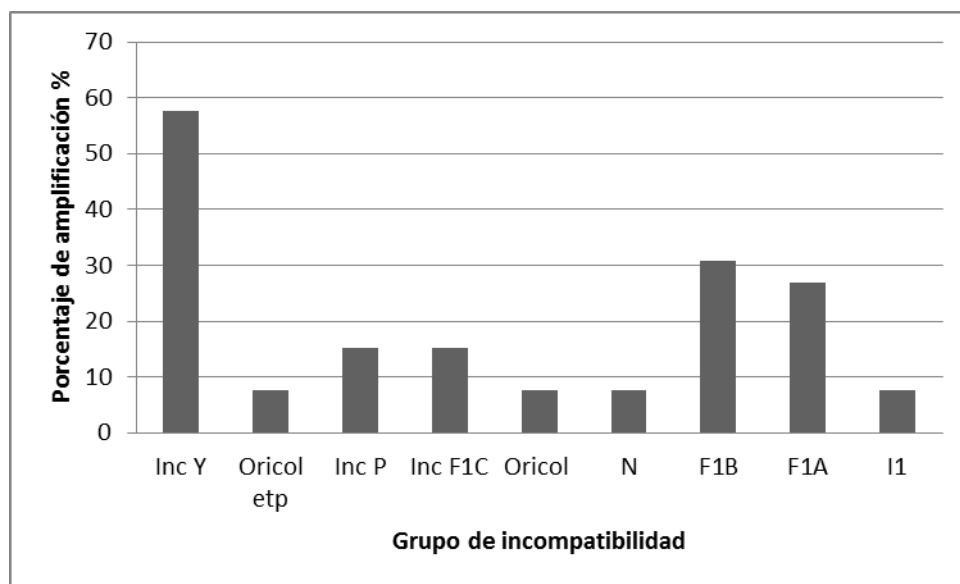


Gráfica 8. Porcentaje de cepas pertenecientes a cada uno de los filogrupos encontrados de las 26 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.

Objetivo 8: Caracterización plasmídica parcial en algunas cepas clínicas de *E. coli* productoras de BLEE y resistentes a quinolonas.

En las 26 cepas estudiadas se realizó la búsqueda de replicones plasmídicos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad (Inc) reportados por Carattoli y colaboradores (Carattoli *et al.*, 2005a).

En estas cepas estudiadas, al menos 9 diferentes replicones plasmídicos fueron identificados por PCR, siendo IncY (57.6%), IncFIB (30.7%) e IncFIA (26.9%) los más prevalentes (Gráfica 9).



Gráfica 9. Porcentaje de cepas pertenecientes a cada uno de los replicones plasmídicos encontrados de las 26 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla.

Cepa	Servicio	β - Lactamasa	Otros genes de resistencia	Replicon	Filogrupo	Isla de Patogenicidad	Serotipo
I-0002	Medicina Interna	CTXM-15,OXA	-	IncY	B2	-	O102:H6
I-0003	Medicina Interna	CTXM-15, OXA	<i>acc(6')-lb-cr</i>	Oricoletp	B2	PAI II CFT073	O28:H5
I-0004	Medicina Interna	CTXM-15, OXA	-	IncP,IncF1C,IncY,Oricoletp	B2	PAI II CFT073	OR:H4
I-0006	Endocrinología	CTXM-15, OXA	<i>qnrB</i>	IncP,IncY	F	PAI I CFT073	O1:H6
I-0011	Unidad de cuidados intensivos	TEM,CTXM-15,OXA	<i>qnrB</i>	IncF1C	B1	-	-
I-0012	Medicina Interna	CTX-M	<i>acc(6')-lb-cr</i>	Oricol	MLST	PAI II CFT073	O25:H4
I-0013	Medicina Interna	CTXM-15, OXA	<i>acc(6')-lb-cr y qnrB</i>	IncP,IncY	MLST	PAI I y II CFT073	O25:H4
I-0014	Cirugía General	CTXM-15, OXA	-	IncY,IncN	MLST	-	O25:H4
I-0015	Medicina Interna	-	-	-	B2	PAI I y II CFT073	-
I-0019	Medicina Interna	CTX-M	-	IncY	B1	PAI II CFT073	O100:H12
I-0022	Medicina Interna	CTX-M	-	IncY,F1B	D	-	O25:H4
I-0026	Medicina Interna	CTX-M	-	-	B2	PAI II CFT073	OR:H4
I-0005	Medicina familiar	CTXM-15, OXA	<i>acc(6')-lb-cr</i>	IncP,IncF1C,oricol	D	PAI I y II CFT073	O25:H4
I-0016	Medicina familiar	CTXM-15	-	IncF1C	B2	PAI I y II CFT073	O25:H4
I-0018	Medicina familiar	TEM,CTX-M15,OXA	-	IncY,IncF1A,IncF1B	B2	-	O25:H4
I-0021	Urología/Consulta Externa	CTX-M	-	IncY	A	-	OR:H4
I-0023	Ginecoobstetricia	CTX-M	-	IncY,IncF1A	B2	-	O9:H19
I-0024	Medicina Familiar	CTX-M	-	IncY	D	PAI I y II CFT073	OR:H19
I-0025	Urología/Consulta Externa	CTX-M	-	IncY,IncF1A	F	-	O100:H-
I-0027	Urología/Consulta Externa	CTXM-15, OXA	-	IncY	Clado I o II	-	-
I-0028	Nefrología/ consulta Externa	CTXM-15, OXA	-	IncY,IncF1A,IncF1B	B2	PAI I y II CFT073	O25:H4
I-0029	Urología/Consulta Externa	CTX-M	-	IncY,IncF1A,IncF1B	B2	PAI II CFT073	OR:H4
I-0030	Urología/Consulta Externa	CTXM-15, OXA	-	IncI1,IncF1A	Clado I o II	-	O101:H-
I-0032	Trasplante/consulta Externa	CTX-M	<i>qnrB</i>	IncI1,IncF1B	MLST	PAI II CFT073	OR:H5
I-0033	Urología/Consulta Externa	CTX-M	-	IncF1B	F	PAI I CFT073	OR:H-

I-0034	Medicina familiar	TEM	-	incF1B,IncN	A	PAI II CFT073	O25:H4
I-0036	Urología/Consulta Externa	CTXM-15, OXA	-	IncF1A,IncF1B	D	PAI II CFT073	OR:H4

Tabla 13. Características fenotípicas y genotípicas de las 26 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla

DISCUSIÓN

Escherichia coli es quizá el microorganismo más ampliamente estudiado debido a que es de los habitantes comensales más comunes del tracto gastrointestinal y uno de los patógenos más importantes en los humanos, siendo de las principales bacterias Gramnegativas causantes de infección del tracto intestinal, urinario y de torrente sanguíneo.

La gran plasticidad genómica de *E. coli* le confiere una flexibilidad ecológica extraordinaria, permitiéndole adaptarse rápidamente a diferentes ambientes y diferentes hospederos, teniendo la capacidad de adquirir distintos genes de virulencia y resistencia, volviéndose un microorganismo potencialmente patógeno tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad.

En este trabajo se estudiaron los aspectos fenotípicos y genotípicos de aislados clínicos de *E. coli* productores de BLEE y resistentes a quinolonas, provenientes del Hospital Regional ISSSTE de Puebla que atiende a pacientes de todas las edades; las cepas se aislaron en un periodo de 7 meses (septiembre de 2015 a abril de 2016).

Cabe mencionar que los aislados ya habían sido identificados y catalogados como multirresistentes, de acuerdo a los antibióticos de rutina ensayados en este hospital. Sin embargo, cuando nos fueron proporcionados se volvieron a identificar mediante pruebas bioquímicas, teniendo un total de 30 aislados identificados como *E. coli*.

El origen de los aislamientos fue variado, siendo el servicio de medicina interna quien proporcionó el mayor número de cepas (10/33.3%), y a partir de urocultivo el mayor origen de aislamiento de las mismas (25/83.3%). El perfil de multirresistencia de estas 30 cepas fue alto, siendo resistentes a los β -lactámicos por arriba del 80% para 6 antibióticos: AMP, CTX, CAZ, CRO, FEP y ATM (100, 90, 70, 86, 80 y 80%, respectivamente); para AMC y FOX fue menor con un 36 y 10% de las cepas respectivamente. De igual manera para las dos quinolonas ensayadas (NA y CIP) la resistencia fue alta con un 86% para ambos antibióticos. Estos valores coinciden con otros reportes en el Estado de Puebla, como el estudio de Cortés en 2012, que encontró resistencia a β -lactámicos en promedio, por arriba del 80%. En el caso de las quinolonas de igual manera se encontró cepas resistentes por arriba del 80%. Este dato es interesante ya que en el cuadro básico de antibióticos que se utilizaba en el hospital durante el periodo en que se recolectaron las muestras, las quinolonas no figuran como medicamentos de primera elección; sin embargo, se presenta una tasa elevada de resistencia a esta familia de antibióticos siendo este un claro ejemplo de la diseminación de genes de resistencia en ausencia de presión selectiva ya que la bacteria no necesariamente tuvo que estar en contacto con el antibiótico para adquirir resistencia. La presencia de replicones plasmídicos que existen en estas cepas, determinados por medio del método propuesto por Carattoli y colaboradores (Carattoli *et al.*, 2005a), nos puede sugerir que la transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos puede ser el posible mecanismo de la diseminación de la resistencia entre estas cepas. El hecho de encontrar cepas que sean resistentes a β -

Lactámicos aún sin estar en contacto con estos últimos antibióticos, se puede deber a un proceso de co-selección, en donde un mismo elemento genético movilizable pueden ser transferir diferentes genes de resistencia, como se ha visto en otros estudios.

En el caso de los aislados estudiados, varios de ellos mostraron perfiles de resistencia similares, lo que pudiera sugerir que pudieran ser una misma clona, cuando se trata de un mismo hospital y de una misma unidad hospitalaria; sin embargo, esto no siempre ocurre, por lo cual para conocer si estaban o no relacionados genéticamente, se llevó a cabo la tipificación mediante la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) utilizando la enzima *XbaI*, de los aislados obtenidos del Hospital ISSSTE de Puebla se obtuvieron 28 PT's y solo un grupo de aislados genéticamente relacionados. De acuerdo a estos resultados, inferimos que existe una amplia diversidad genética entre los aislados de este hospital, los cuales provenían de distintas áreas hospitalarias y fueron recolectadas dentro de un periodo de tiempo corto, lo que nos indica que no existió la presencia de un brote, pues no hubo pulstotipos que prevalecieran en el dendograma obtenido.

Con los resultados obtenidos y las comparaciones con los perfiles de susceptibilidad, podemos observar que contrario a lo que se podría pensar, aislados con fenotipos o genotipos similares pueden no tener relación genética, mientras que los que difieren en estas características pueden estar relacionados genéticamente.

Para el caso del único grupo de aislados relacionados: tenemos las cepas I-0015 e I-0016, las cuales presentaron solo dos diferencias en los patrones de bandeo a pesar de tener diferentes orígenes y unidades de procedencia. La primera es aislada de Urocultivo del área de medicina interna y pertenece al grupo filogenético B2, la cual en el perfil de susceptibilidad resulto ser sensible a casi todos los β -lactámicos con excepción de la ampicilina y la ceftriaxona, pero fue resistente a las dos quinolonas evaluadas; mientras que la cepa I-0016 fue aislada de Urocultivo del área de medicina familiar, también del grupo filogenético B2; sin embargo, esta cepa resulto ser resistente a la mayoría de los β -lactámicos y quinolonas evaluados, con excepción de la cefoxitina. Aunque se necesitarían análisis más específicos como el MLST para determinar si estas dos cepas pertenecen al mismo complejo clonal, con los datos obtenidos podríamos sugerir que la cepa I-0015 posiblemente portaba genes de resistencia a β -Lactámicos en elementos genéticos movilizables, como pueden ser plásmidos, los cuales perdió al no ser necesarios en el ambiente en el que se encontraba, mientras que la cepa I-0016 los mantuvo, hecho que podemos apoyar con el resultado de que en esta cepa encontramos los genes *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{OXA-1}* y *aac(6')-Ib-cr* lo cual coincide con el resultado reportado por Coque y cols., en 2008, quién describió la presencia de estos genes en el mismo plásmido en cepas de *E. coli*. (Coque et al., 2008). Se sugiere investigar este resultado.

Una vez que se determino el hecho de que la colección de cepas tenía una amplia diversidad genética, procedimos a realizar la búsqueda y amplificación de genes que codifican BLEE. De las 30 cepas de *E. coli*, se seleccionaron 26 (86.6%), las cuales tuvieron un fenotipo de multirresistencia, principalmente a la mayoría de los β -Lactámicos

y a las dos quinolonas ensayadas. De estas cepas, todas amplificaron el fragmento del gen *bla*_{CTX-M} universal. Para profundizar un poco más en este resultado, se buscó si estos genes encontrados pertenecían a la variante de CTX-M15, la cual está ampliamente distribuida en *E. coli* a nivel mundial en diferentes nichos, obteniendo que solo 13 (50%) amplificaron para esta variante. Para los demás genes de las principales β -Lactamasas, 3 cepas amplificaron el gen *bla*_{TEM} (11.5%); 17 cepas el gen *bla*_{OXA} (65.3%) y ninguna cepa dio positivo para la amplificación del gen *bla*_{SHV}.

Es interesante resaltar que las cepas I-0011 e I-0018 dieron positivo a la presencia de los tres genes, *bla*_{CTXM-15}, *bla*_{OXA} y *bla*_{TEM} los cuales también dieron positivo en la presencia de replicones plasmídicos de tipo IncF1A, IncF1B e IncF1C, lo cual nos sugiere que estos genes se encuentran en plásmidos conjugativos de los tipos antes mencionados, hecho que podría coincidir con los reportes en Europa de Woodford y colaboradores en 2009 (Woodford *et al.*, 2009), los cuales reportan la presencia de estos mismos genes de resistencia en un plásmido conjugativo de tipo IncF1A.

Para el caso de los genes de resistencia a quinolonas, solo 7 (26%) cepas evidenciaron la presencia de 1 o 2 genes plasmídicos de resistencia a quinolonas como *acc* (6')-*lb-cr* y *qnrB*. Sin embargo, el perfil de susceptibilidad demuestra que la mayoría de las cepas (86%) son resistentes a quinolonas, esto nos sugiere que el principal mecanismo de resistencia puede deberse a mutaciones cromosómicas en los genes blanco *gyrA* y *parC* como lo reporta Mohammad y colaboradores (Mohammad *et al.*, 2018), por lo que sería importante realizar la determinación de las mutaciones en estos genes.

A las 26 cepas se determinó el grupo Filogenético, encontrando la presencia de cinco grupos, siendo en orden decreciente de frecuencia, B2 (9), D(4), F(3), B1(2) y A(2). Si bien el hecho de que la mayoría de las cepas pertenecieron a los grupos en donde se encuentran mayoritariamente las cepas extraintestinales, al encontrar otros grupos filogenéticos en estas cepas que están provocando una infección en los pacientes, pone de manifiesto la probable adquisición horizontal de genes de resistencia que las llevan a convertirse en multirresistentes y patógenas.

Por ello, se realizó la búsqueda de algunos marcadores de patogenicidad como las islas de patogenicidad (PAIs) características de cepas de UPEC, por lo que se determinaron: CFT073, J96 y 536. Un poco más de la mitad de las cepas (53.8%) amplificaron para 1 o las 2 islas de patogenicidad de la cepa CFT073, mientras que ninguna dio positivo para los marcadores de las islas de las cepas j96 y 536. Es importante mencionar la presencia de estos marcadores ya que las islas de patogenicidad presentan mucha plasticidad y variación por la inserción y delección de fragmentos de DNA que sufren estas cepas debido a los procesos de recombinación o la presencia de elementos genéticos movilizables, por lo que encontrar estos marcadores de patogenicidad nos habla de que tan conservados se encuentran en estas cepas. Así mismo, el encontrar estos marcadores nos sugiere que estas cepas son de tipo extraintestinal, como se ha reportado en diversos estudios.

En 2008, el grupo clonal de *Escherichia coli* (ST131), fue identificado en tres continentes. Hoy, ST131 es el linaje de *E. coli* predominante entre las cepas de tipo extraintestinal a nivel mundial (Chanoine *et al.*, 2014). Este complejo clonal se considera como un patógeno, debido al espectro de infecciones que causan tanto en entornos comunitarios como hospitalarios y la gran cantidad de genes asociados a la virulencia que contienen.

Los primeros aislamientos clínicos de *E. coli* ST131 identificados alrededor del mundo se caracterizó por tres rasgos epidemiológicos principales. Todos ellos produjeron CTX-M-15, fueron resistentes a las fluoroquinolonas, y causó infecciones tanto en el hospital como en la comunidad. Estos rasgos fueron por lo tanto utilizados a menudo como un antecedente para evaluar la prevalencia de *E. coli* ST131 entre aislamientos clínicos de *E. coli*. Posteriormente, este esquema de clasificación para ST131 y sus subclonas se amplió con la búsqueda del grupo filogenético y serotipo encontrando que la mayoría de estas clonas pertenecía al filogrupo B2 y tenían un serotipo O25:H4.

Con respecto al serotipado de estas cepas es notable destacar a las cepas I-0016, I-0018 e I-0028 que pertenecen al grupo filogenético B2 y pertenecen al serotipo O25:H4 como se muestra en la tabla 13, lo cual nos puede sugerir la presencia de la clona ST131, que está altamente diseminada en distintos nichos ecológicos y que acarrea plásmidos conjugativos que albergan diferentes genes de resistencia. Se sugiere confirmar la presencia de este subtipo ST131 en otro estudio.

Este estudio nos muestra la importancia de realizar una constante vigilancia epidemiológica en las unidades hospitalarias, ya que como pudimos observar en un periodo corto de tiempo encontramos cepas multidrogo resistentes de *Escherichia coli extraintestinal* portadoras de genes BLEE y de resistencia plasmídica a quinolonas aisladas en distintas áreas de la unidad hospitalaria, tanto de pacientes hospitalizados como de la comunidad lo que puede suponer un peligro debido a la fácil transmisión de estas cepas hacia otros hospederos así como la diseminación de genes de resistencia por elementos genéticos movilizables.

CONCLUSIONES

- ❖ Se encontró multirresistencia en el 86.6% (26/30) de las cepas provenientes del Hospital regional ISSSTE de Puebla, presentando todas ellas una resistencia por arriba del 80% a los antibióticos β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos.
- ❖ De las 26 cepas seleccionadas, las 26 amplificaron el fragmento del gen *bla*_{CTX-M} universal, 13 amplificaron para la variante *bla*_{CTX-M15}, 3 cepas amplificaron el gen *bla*_{TEM} (11.5%); 17 cepas el gen *bla*_{OXA} (65.3%).
- ❖ El grupo filogenético a las 26 cepas de *E. coli* encontrando fue: el 34.6% correspondieron al grupo filogenético B2, 15.38% al filogrupo D, 11.5% al filogrupo F, 7.69% al filogrupo B1, 7.69% al filogrupo A.
- ❖ Una tercera parte de los aislados clínicos estudiadas (34.6 %) pertenecen al grupo filogenético B2, en el cual se encuentran agrupadas las cepas patógenas de *Escherichia coli*.
- ❖ 3 cepas procedentes del grupo filogenético B2 tuvieron un serotipo O25:H4 lo cual nos puede sugerir la presencia de la clona ST131.
- ❖ En 13 cepas de *E. coli* se demostró la asociación del grupo filogenético bacteriano con el origen del aislamiento (grupos D y B2, catalogadas como extra-intestinales).
- ❖ De las 26 cepas estudiadas, el 53.8% posee una o dos islas de patogenicidad de la cepa CFT073 de UPEC.
- ❖ Se puso de manifiesto la presencia de cepas de *Escherichia coli* extraintestinales, multidrogoresistentes portadoras de genes BLEE y resistentes a quinolonas tanto en pacientes hospitalizados y de la comunidad. Se puede sugerir que algunas de estas cepas podrían portar estos genes de resistencia en elementos genéticos movilizables por ejemplo plásmidos debido a la presencia de replicones plasmídicos.

PERSPECTIVAS

- ❖ Determinar la variante de las diferentes BLEE encontradas.
- ❖ Determinar el ST131 en las cepas del grupo filogenético B2 que tuvieron un serotipo O25: H4.
- ❖ Determinar las mutaciones de los genes cromosómicos *gyrA* y *parC*.
- ❖ Determinar el Virotipo de las cepas analizadas.
- ❖ Determinar la localización plasmídica de algunos determinantes de resistencia.
- ❖ Estudiar la transferencia de determinantes de resistencia mediada por plásmidos.
- ❖ Caracterizar el perfil plasmídico en cepas donadoras y transconjugantes.
- ❖ Determinar el tamaño y número de plásmidos mediante Electroforesis de Campos Pulsados.
- ❖ Determinar la localización plasmídica de algunos determinantes de resistencia.

REFERENCIAS

- Álvarez-Hernández, Diego Abelardo, Garza-Mayén, Gilda Sofía, & Vázquez-López, Rosalno. (2015). Quinolonas: Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Revista chilena de infectología*, 32(5), 499-504.
- Bradford PA. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14: 933-51.
- Briñas L. *et al.* 2005. Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 56:1107-1110.
- Brisse, S., van Himbergen, T., Kusters, K., Verhoef, J. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10:942.
- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 54:969-976.
- Buynak, J. D. 2006. Understanding the longevity of the beta-lactam antibiotics and of antibiotic/beta-lactamase inhibitor combinations. *Biochem. Pharmacol.* 71:930-940.
- Cantón R. 2008. Epidemiology and evolution of betalactamases. En: *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens.* Baquero F, Nombela C, Cassell GH, Gutiérrez-Fuentes JA (eds). ASM Press, Washington D.C. pp. 249-270.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005a. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*; 63:219-228.
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*; 58:3895-9.
- Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 53:2227-38.
- Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*; 303:298-304.
- Caroff, N., Espaze, D., Gautreau, H., Richet, H., Reynaud, A. 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutation in clinical isolates of *Escherichia coli* hyper-producing AmpC. *J Antimicrob Chemother.* 45(3): 783-788.

- Cattoir V., Poirel L., and Nordmann P. 2008. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Pump QepA2 in an *Escherichia coli* Isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3801-3804.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*; 66:4555-8.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*; 5(1):58-65.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eighteenth Informational supplement. CLSI document M100-S18. Wayne. PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- Coque, TM., Baquero, F., Canton, R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 2013.
- Coque, TM., Novais A., Carattoli, A. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15.
- Cornejo-Juarez, P., Perez-Jimenez, C., Silva-Sanchez, J., Velazquez-Acosta, C., Gonzalez-Lara, F., Reyna-Flores, F., Sanchez-Perez, A., Volkow-Fernandez, P., 2012. Molecular analysis and risk factors for *Escherichia coli* producing extended spectrum β -lactamase bloodstream infection in hematological malignancies. *PLoS One* 7, e35780.
- Correia, S., Poeta, P., Hebraud, M., Capelo, J. L., and Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J. Med. Microbiol.* 66, 551–559. doi: 10.1099/jmm.0.000475
- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. 2013. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol*; 303:305-317.
- García Sánchez JE, Fresnadillo Martínez MJ, Arce Arce JJ, García Sánchez E. Antibióticos betalactámicos. In: García Sánchez JE, López R, Prieto J, editores. *Antimicrobianos en Medicina*. Barcelona. 1a ed. Prous Science; 1999. p. 213–49.11. Wright AJ. The penicillins. *Mayo Clin Proc.* 1999;74:290–307.
- Gautam RK. 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol*; 35:2977-80.
- Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. *Curr Issues Mol Biol.* 2014;17:11-22.

- Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G. and Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum betalactamases conferring transferable resistance to newer B-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* 10: 867-878.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. doi:10.1038/nrmicro818.
- Kim, H. B., Park C. H., Kim E. C., Jacoby G. A. Hooper D. C. 2009. *oqxAB* Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3582–3584.
- Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH. Brundage RP. 1962. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *J Med Chem.* 5: 1063-65.
- Livermore D.M.1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557–84.
- Livermore D.M.1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557–84.
- Mac Faddin, Jean F. 2003. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica.* Buenos Aires; México, D.F. Médica Panamericana.
- Martínez-Martínez L, Eliecer Cano M, Manuel Rodríguez-Martínez J, Calvo J, Pascual A. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 6(5):685-711. Review.
- Maruri F, Sterling T R, Kaiga A W, Blackman A, van der Heijden Y F, Mayer C, et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67 (4): 819-31.
- Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, Park Y-J, Lavigne J-P, Pitout J, Johnson JR. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J. Antimicrob. Chemother.* 61:273–281. doi:10.1093/jac/dkm464
- Paterson DL. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control*; 34(5 Suppl 1):S20-8; discussion S64-73.
- Paterson, DL., Bonomo, RA. 2005. Extended-spectrum betalactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 18: 657-86.
- Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinions. Microbiology.* 2001;4:500–8

- Rocha-Gracia R, Ruiz E, Romero-Romero S, Lozano-Zarain P, Somalo S, Palacios JM, Caballero P and Torres C. 2010. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant *qepA1* in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1-3.
- Rodríguez, N. E., León G. G., Petersen, M. S., Pérez, G. H. 2014 La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. México
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 880–886. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01461.
- Sørensen, A. H., L. H. Hansen, E. Johannesen, and S. J. Sørensen. 2003. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:798–799.
- Souza V, Castillo A, Rocha M. Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *Rev. INCI*. Vol. 2001; 26(10): 513 – 517.
- Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas Microbiol Clin* 2009; 27(2):116-129
- Suárez C., Kattán, J., Guzmán, A., Villegas, M. 2008. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infection*. 10(2): 85-93.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*; 33:2233-9.
- Valenza G, Nickel S, Pfeifer Y, Eller C, Krupa E, Lehner-Reindl V, et al. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as intestinal colonizers in the German community. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1228–30.
- Wang C, Sabbaj J, Corrado M, Hoagland V. 1986. World-wide clinical experience with norfloxacin: efficacy and safety. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement*. 48:81-89.
- Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. 2009. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4472–4482.<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00688-09>.
- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*; 35:736-55.

- Woodford, N., Ward, ME., Kaufmann, ME., Turton, J., Fagan, EJ., James, D., Johnson, AP., Pike, R., Warner, M., Cheasty, T., Pearson, A., Harry, S., Leach, JB., Loughrey, A., Lowes, JA., Warren, RE., Livermore, DM. 2004. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother. 54: 735-43

ANEXO 1

Pruebas Bioquímicas

Preparación

Todos los medios de cultivo se adquirieron de la casa comercial Bioxon ® y fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del fabricante y bajo condiciones de completa esterilidad (al medio OF se agregó como carbohidrato problema la glucosa y las pruebas de oxidasa y catalasa se prepararon como se indica en el anexo 1). Posteriormente de ser preparados se colocaron 4 mL de cada medio en tubos de ensayo, se les colocó un tapón de corcho o algodón, se esterizaron y se esperó a que gelificaran de la siguiente forma: los tubos de las pruebas TSI, Citrato, LIA, Urea y Fenilalanina fueron inclinados para obtener un pico de flauta final; MIO, MRVP y OF se mantuvieron de forma vertical. El medio de cultivo MC fue vertido en placas de Petri. Todos los tubos y placas se colocaron a prueba de esterilidad y posteriormente se guardaron en el refrigerador de 4 °C hasta su uso.

Siembra

Las pruebas bioquímicas se sembraron a partir de un cultivo puro en agar TSA (Bioxon ®) de 18 a 24 horas, seleccionando una colonia de crecimiento con un asa recta bacteriológica y sembrándola en las pruebas bioquímicas en el siguiente orden y forma de inoculación (Barrow and Feltham, 2004):

- ❖ Fenilalanina: se inoculó mediante estría en la superficie del agar.
- ❖ Urea: se realizó la estría del inóculo en la superficie del medio de cultivo.
- ❖ Citrato: se estrió solamente en la superficie del agar del pico de flauta.
- ❖ TSI: se estrió en el pico de flauta con una picadura central hasta el fondo.
- ❖ LIA: se estrió en la superficie del agar e hicieron 2 picaduras profundas, una en la parte más alta del pico de flauta y la otra en el pico más bajo del pico.
- ❖ MIO: se realizó una picadura en el centro del tubo.

Lectura e interpretación

Posteriormente de haber realizado la siembra de cada una de ellas, se incubaron a 37 °C por 24 horas, y tras la incubación se leyeron las pruebas bioquímicas bajo las siguientes pautas (Barrow and Feltham, 2004):

- ❖ Fenilalanina: para la lectura se agregan 3 gotas de reactivo para fenilalanina desaminasa, un resultado positivo es la formación de un color verde pálido a intenso en el pico de flauta y en el líquido de condensación, lo que indica la desaminación de la fenilalanina, una prueba negativa no presenta cambio de color.
- ❖ Urea: un resultado positivo fue la generación de un color rosa-rojo intenso en el pico de flauta y/o en el interior del agar, la extensión del color indica la velocidad de la hidrólisis de la urea, resultado de una producción de la enzima ureasa, un resultado negativo no generó cambio de color, es decir, el tubo se mantuvo de color piel a amarillo pálido.

- ❖ Citrato: una interpretación positiva consistió en un crecimiento del microorganismo en la superficie del medio y/o el cambio a color azul intenso en el pico de flauta, mientras que un resultado negativo no presentó ningún cambio en el medio de cultivo ni crecimiento alguno.

- ❖ TSI: un cambio de color a rojo en la superficie y amarillo en el fondo se consideró como una prueba “Alcalino/Ácido”, lo que significa únicamente la fermentación de la glucosa; un cambio en todo el tubo a amarillo (“Ácido/Ácido”) se considera como la fermentación de la glucosa y lactosa y por último el tubo de color rojo o sin cambio de color se consideró como la ausencia de fermentación de glucosa y lactosa (“Alcalino/Alcalino o Inerte”). La producción de gas se pudo observar con la formación de burbujas en el medio, ya sea en el fondo del mismo o a lo largo del medio de cultivo; la producción de Ácido Sulfhídrico (SH_2) se observó con la pigmentación de color negro demasiado intenso en la prueba bioquímica.

- ❖ LIA: la interpretación de la descarboxilación de la lisina consistió en el pico de flauta púrpura y el extremo inferior púrpura con SH_2 o sin él (prueba positiva), un resultado negativo fue la generación de un color amarillo pálido o sin cambio en el tubo; la desaminación de la lisina se consideró como un pico de flauta rojo y el extremo inferior del tubo amarillo, una prueba negativa no generó el color rojo en el pico de flauta. La producción positiva de SH_2 se consideró como la reacción en el extremo inferior de color negro intenso.

- ❖ MIO: para la lectura de la Movilidad se consideró positivo la migración del crecimiento desde la línea de siembra y difusión del medio, lo que produce turbidez en medio, un resultado negativo fue un crecimiento únicamente a lo largo de la línea de siembra; para la lectura de la prueba de Indol, se agregaron 3 gotas del reactivo de Kovac's al tubo de la prueba bioquímica, un resultado positivo fue la aparición, en segundos, de un anillo rojo en la interfase del medio con la porción inferior de la fase alcohólica sobre el medio.

ANEXO 2 Preparación De Soluciones

1) Solución Salina Isotónica 0.85 %

Cloruro de sodio 0.85 g
Agua destilada La necesaria para aforar a 100 mL

Preparación: realizar la solución en un frasco y mantener en refrigeración.

2) Bromuro de etidio 100 μ M

Bromuro de etidio 0.0099 g
Agua destilada 25 mL

Preparación: disolver vigorosamente los componentes y de esta disolución tomar 5 mL y disolverlos en 50 mL de agua destilada para así obtener la concentración deseada.

Anexo 3

Preparación de soluciones para PFGE

PFGE:

1. Buffer SE

75mM NaCl + 25mM EDTA, pH 8

Stock 400 ml de NaCl 5M:

Pesar 58.44 g de NaCl, disolver en agitación y aforar a 400 ml con H₂O destilada.

Stock 100 ml de EDTA 0.5M pH=8:

Pesar 18.612 g de EDTA, disolver en agitación, ajustar a pH 8 con lentejas de NaOH y aforar a 100 ml con agua destilada.

Preparación: 100 ml

Mezclar 1.5 ml de NaCl 5M + 5 ml de EDTA 0.5M pH= 8, aforar a 100 ml y esterilizar a 15 libras por 15 min.

2. Buffer TE

10mM Tris y 1mM EDTA

Stock 100 ml de Tris 1M:

Pesar 3.028 g de Tris, disolver en agitación y aforar a 100 ml con H₂O destilada.

Stock 100 ml de EDTA 0.5M pH= 8:

Usar el stock de la solución anterior.

Preparación: 1L

Mezclar 10 ml de Tris 1M + 2 ml de EDTA 0.5M pH= 8, aforar a 1L y esterilizar a 15 libras por 15 min

3. Buffer de lisis

50 mM Tris; 50 mM EDTA, pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K.

Preparación: 100 ml Mezclar 5 ml de Tris 1M + 10 ml de EDTA 0.5M pH= 8 + 80 ml de H₂O y esterilizar a 15 libras por 15 min. Dejar enfriar y agregar 5 ml de sarcosil al 20%. Al momento de utilizar, agregar 495 µl de proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®)

